



Seguiment i interpretació de la degradació de contaminants bromats mitjançant tècniques cromatogràfiques, espectroscòpiques i quimiomètriques

Sílvia Mas Garcia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de doctorat:
QUÍMICA ANALÍTICA DEL MEDI AMBIENT I LA POL·LUCIÓ
(BIENNI: 2005-2007)

**SEGUIMENT I INTERPRETACIÓ DE LA DEGRADACIÓ DE
CONTAMINANTS BROMATS MITJANÇANT TÈCNIQUES
CROMATOGRÀFIQUES, ESPECTROSCÒPIQUES I QUIMIOMÈTRIQUES**

Memòria presentada per Sílvia Mas Garcia per a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Maig 2012

Directors:

Dra. Anna de Juan Capdevila

Dr. Romà Tauler Ferré

La Dra. Anna de Juan Capdevila, professora titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i el Dr. Romà Tauler Ferré, professor d'Investigació del Departament de Química Ambiental de l'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas

FAN CONSTAR:

que la present memòria titulada “SEGUIMENT I INTERPRETACIÓ DE LA DEGRADACIÓ DE CONTAMINANTS BROMATS MITJANÇANT TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES, ESPECTROSCÒPIQUES I QUIMIOMÈTRIQUES” ha estat realitzada sota la nostra direcció per la Sra. Sílvia Mas Garcia en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i en el Departament de Química Ambiental de l'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Barcelona, Maig 2012

Dra. Anna de Juan Capdevila

Professora titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

Dr. Romà Tauler Ferré

Professor d'Investigació del Departament de Química Ambiental de L'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Als meus pares

“La paciència comença amb llàgrimes i, al final, somriu.”

Ramon Llull

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

2BP	2-bromofenol
3BP	3-bromofenol
4BP	4-bromofenol
24DBP	2,4-dibromofenol
246TBP	2,4,6-tribromofenol
PBP	pentabromofenol
ABS	Acrilonitril butadiè estirè
ACN	Acetonitril
DNA	Àcid desoxiribonucleic
ANN	Xarxes neuronals artificials
ALS	Mínims quadrats alternats
APCI	Ionització química a pressió atmosfèrica
API	Ionització a pressió atmosfèrica
AsLS	Mínim quadrats asimètrics
BFR	Retardants de flama bromats
BP	Bromofenols
C ₁₈	Fase estacionària d'octadecilsilà
CART	Mètode de classificació i arbre de regressió
CE	Energia de col·lisió
CI	Ionització química
CNI	Ionització química en mode negatiu
CUR	Gas de cortina
CV	Voltatge de capil·lar aplicat en la ionització
CXP	Potencial de la cel·la de col·lisió
CYP	Enzims monooxigenases que depenen del citocrom P450
CYP _{reductasa}	Citocrom P450 reductasa
DMSO	Dimetilsulfòxid
EFA	Anàlisi de factors emergents (<i>Evolving Factor Analysis</i>)
EI	Impacte electrònic
ESI (o ISP)	Ionització d'electrosprai
EP	Potencial d'entrada
EPA	Agència dels Estats Units d'Amèrica per a la prevenció i protecció del medi ambient

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

EtOH	Etanol
decaBDE	decabromodifenilèter
DecaBDE	Producte comercial que conté majoritàriament el compost decabromodifenilèter
DFT	Teoria del funcional de la densitat
FMO	Enzims flavin-monooxygenases
FP	Potencial focalitzador
FR	Retardants de flama
FTIR	Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier
GA	Algoritmes genètics
GC-ECD	Cromatografia de gasos acoblada a un detector de captura d'electrons
GC- μ ECD	Cromatografia de gasos acoblada a un detector de microcaptura d'electrons
GC-FID	Cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama
GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
$H_{25^{\circ}\text{C}}$	Constant de Henry
HBCD	Hexabromociclododecà
$^1\text{H-NMR}$	Ressonància magnètica nuclear de protó
HS-MCR	MCR-ALS de modelització híbrida rígida i flexible
HPLC-DAD	Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a un detector de díodes en sèrie
HPLC-DAD-MS	Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a un detector de díodes en sèrie i a un espectròmetre de masses
HPLC-MS	Cromatografia líquids d'alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses
HPLC-MS/MS	Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem
HPLC-UV	Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a un detector d'absorció molecular ultraviolada a una longitud d'ona.
IR	Infraroig
IUPAC	Unió internacional de química pura i aplicada
k	Constant de velocitat
KNN	Mètode de K veïns més propers
LOF	Manca d'ajust
$\log K_{\text{ow}}$	Coefficient de partició octanol-aigua
ME	Mètode del motor multilinear (<i>Multilinear Engine</i>)

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

MeOH	Metanol
MCR-ALS	Resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (<i>Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares</i>)
MRM	Mode de seguiment d'una reacció múltiple (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MTL	llista de substàncies tòxiques de l'EPA
m/z	Relació massa/càrrega
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduïda
NEB	Gas nebulitzador
NGL/M	Mètode Newton-Gauss-Levenberg/Marquardt
NIR	Infraroig proper
NRS	Sistema regenerador dependent del nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduïda
octaBDE	Grup d'homòlegs d'octabromodifenilèters
OctaBDE	Producte comercial que conté majoritàriament hepta i octabromodifenilèters
ODE	Equacions diferencials
PAH	Hidrocarburs aromàtics policíclics
PARAFAC	Anàlisi de factors paral·lels (<i>Parallel Factor Analysis</i>)
PBDD	Dibenzodioxines polibromades
PBDE	Difenilèters polibromats
PBDF	Dibenzofurans polibromats
PCA	Anàlisi per components principals
PCB	Bifenils policlorats
pentaBDE	Grup d'homòlegs de pentabromodifenilèters
PentaBDE	Producte comercial que conté majoritàriament tetra i pentabromodifenilèters
PLS	Regressió per mínims quadrats parcials
PMF	Factorització positiva de matrius (<i>Positive Matrix Factorization</i>)
P_v	Pressió de vapor
QqQ	Triple quadrupol
QSAR	Relacions quantitatives estructura-activitat
R^2	Percentatge de variància explicada
REACH	Reglament Europeu relatiu al registre, avaluació, autorització i restricció de les substàncies i preparats químics

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

$S_{\text{aigua}(25^{\circ}\text{C})}$	Solubilitat en aigua a 25°C
SPME	Microextracció en fase sòlida
ssq	Suma de quadrats dels residuals
SVD	Descomposició en Valors Singulars
SVM	Màquines de suport vectorial (<i>Support vector machines</i>)
$t_{1/2}$	Temps de vida mitjana
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
T_f	Temperatura de fusió
THF	Tetrahidrofurà
TIC	Corrent iònica total
TLC	Cromatografia en capa prime
UV	Radiació ultraviolada
UVA	Radiació ultraviolada A
UVB	Radiació ultraviolada B
UVC	Radiació ultraviolada C
Vis	Visible
ϕ	Rendiment quàntic

ÍNDIX

1. Objectius i estructura de la tesi	1
1.1. Objectius	3
1.2. Estructura de la tesi	4
1.3. Relació dels treballs científics presentats en la memòria	5
 2. Introducció	 7
2.1. Els retardants de flama bromats	9
2.1.1. Els difenilèters polibromats	10
2.1.1.1. Característiques generals	10
2.1.1.2. Producció i usos. Presència i toxicitat	15
2.1.2. Els bromofenols	19
2.1.2.1. Característiques generals	19
2.1.2.2. Producció i usos. Presència i toxicitat	21
2.2. Mecanismes de degradació dels retardants de flama	25
2.2.1. Estudis de fotodegradació	27
2.2.1.1. Estudis de fotodegradació dels difenilèters polibromats. Antecedents	32
2.2.1.2. Estudis de fotodegradació dels bromofenols. Antecedents	40
2.2.2. Estudis de biodegradació	44
2.2.2.1. Estudis de biotransformació dels difenilèters polibromats. Antecedents	51
2.3. Bibliografia	54
 3. Part experimental	 65
3.1. Processos de fotodegradació	67

ÍNDIX

3.1.1. Fonts de radiació	67
3.1.2. Seguiment cinètic mitjançant espectroscòpia d'absorció molecular	69
3.1.3. Seguiment cinètic mitjançant cromatografia	72
3.2. Processos de biodegradació	83
3.2.1. Anàlisi dels productes d'hidroxilació mitjançant cromatografia de líquids amb espectrometria de masses	86
3.3. Bibliografia	89
4. Tractament de dades	91
4.1. Estructura de les dades en processos químics	93
4.2. Tractament preliminar de les dades	100
4.2.1. Compensació de les dades en la direcció de la resposta	100
4.2.2. Correcció de la línia de base o del senyal de fons	101
4.3. Mètodes d'anàlisi multivariant de processos químics	103
4.3.1. Mètodes de modelització rígida	104
4.3.1.1. Elecció del model químic	105
4.3.1.2. Eliminació dels paràmetres lineals	107
4.3.1.3. Optimització dels paràmetres no lineals	109
4.3.1.4. Anàlisi simultània de diferents experiments	113
4.3.1.5. Limitacions dels mètodes de modelització rígida	115
4.3.2. Mètodes de modelització flexible	118
4.3.2.1. Determinació del nombre de components químics presents en el sistema	119
4.3.2.2. Determinació de les estimacions inicials	122

ÍNDEX

4.3.2.3. Optimització iterativa dels perfils de concentració i dels espectres purs	129
4.3.2.4. Anàlisi simultània de múltiples matrius de dades	137
4.3.2.5. Limitacions del mètode MCR-ALS	142
4.4.2.5.1. Ambigüitats en els perfils resolts	142
4.4.2.5.2. Deficiència de rang	148
4.3.3. Mètodes de modelització híbrida rígida i flexible	151
4.3.3.1. Incorporació de la restricció de modelització rígida	153
4.3.3.2. Avantatges del mètode HS-MCR	157
4.4.4. Comparació dels procediments de modelització de processos	162
4.4. Bibliografia	164
5. Resultats i discussió	169
5.1. Proposta de metodologia quimiomètrica per a l'anàlisi ambiental i al seguiment i interpretació de processos de degradació de contaminants orgànics	171
5.1-I. <i>Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review.</i>	173
5.1-II. <i>Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes.</i>	189
5.1.1. Discussió dels resultats	199
5.1.1.1. Revisió de la metodologia quimiomètrica per a l'anàlisi ambiental de compostos orgànics	199
5.1.1.2. Proposta de metodologia quimiomètrica per a la interpretació i seguiment de processos de fotodegradació	212
5.1.1.2.1. Seguiment cinètic per absorció molecular	214
5.1.1.2.2. Seguiment cinètic per cromatografia amb detecció DAD-MS	216

ÍNDEX

5.1.1.2.3. Anàlisi de les dades acoblades dels cromatogrames HPLC-DAD-MS	218
5.1.1.2.4. Anàlisi de l'acoblament de les dades espectroscòpiques i cromatogràfiques	222
5.1.2. Bibliografia	240
5.2. Seguiment i interpretació de processos de degradació dels difenilèters polibromats	243
5.2-I. <i>Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard^{IX} and soft-modelling approach</i>	247
5.2-II. <i>Comprehensive liquid chromatography–ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices</i>	259
5.2-III. <i>In vitro metabolism of decabromo diphenyl ether using rat microsomes</i>	269
5.2.1. Discussió dels resultats	273
5.2.1.1. Estudi de fotodegradació del DecaBDE	273
5.2.1.1.1. Seguiment cinètic per absorció molecular	275
5.2.1.1.2. Seguiment cinètic per GC-MS	283
5.2.1.2. Estudi de biotransformació del DecaBDE	287
5.2.2. Bibliografia	297
5.3. Seguiment i interpretació de processos de fotodegradació dels bromofenols	299
5.3-I. <i>Comprehensive description of the photodegradation of bromophenols using chromatographic monitoring and chemometric tools</i>	303
5.3-II. <i>Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques</i>	317
5.3.1. Discussió dels resultats	329

ÍNDEX

5.3.1.1. Seguiment cinètic per absorció molecular	330
5.3.1.2. Seguiment cinètic per cromatografia amb detecció DAD-MS	332
5.3.1.3. Acoblament de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques	349
5.3.2. Bibliografia	354
6. Conclusions	355

CAPÍTOL 1:

Objectius i estructura de la tesi

1.1. OBJECTIUS

La present tesi té com a objectiu general proporcionar una metodologia de seguiment experimental, tractament quimiomètric i interpretació de resultats que sigui vàlida per a l'estudi de qualsevol procés de fotodegradació de contaminants. La metodologia proposada s'orienta a l'ús de diferents tècniques instrumentals (espectroscòpiques i cromatogràfiques) per al seguiment dels processos i a la utilització dels mètodes de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats amb modelització flexible (MCR-ALS) i amb modelització híbrida rígida i flexible (HS-MCR) per al tractament de les dades. Aquest tractament quimiomètric permet l'estimació dels perfils de concentració i dels espectres purs dels diferents productes de degradació, així com l'elucidació del mecanisme i de les constants de velocitat associades al procés. Per altra banda, la metodologia proposada s'orienta també a la gestió i interpretació d'estructures complexes de dades, que impliquen acoblaments cromatogràfics amb doble detecció (detector de díodes en sèrie i espectrometria de masses) i acoblaments inexplorats de dades cromatogràfiques i espectroscòpiques.

Com a objectius més específics, es pretén aplicar la metodologia proposada als estudis de processos de degradació de dues classes de retardants de flama bromats, els difenilèters polibromats i els bromofenols. Es pretén tenir el coneixement del mecanisme d'aquests processos i la caracterització dels productes formats, així com avaluar l'efecte de diversos factors en el desenvolupament de la degradació, tals com el grau de bromació del compost, la font de radiació que indueix la degradació, el medi en què es desenvolupa o l'agent inductor de la degradació (fotodegradació i biodegradació).

1.2. ESTRUCTURA DE LA TESI

La present memòria es presenta com un recull d'articles precedit d'una part introductòria i seguit d'una discussió global de resultats. La tesi consta de sis capítols amb la informació que tot seguit es descriu.

En el primer capítol es presenten els objectius i es detalla l'estructura de la present memòria.

En el segon capítol s'introdueixen els retardants de flama bromats objectiu d'estudi, és a dir, els difenilèters polibromats i els bromofenols. Se'n descriuen les característiques generals, processos de producció i usos, presència i efectes nocius per al medi ambient. En aquest capítol també es presenta un resum dels antecedents sobre estudis de fotodegradació i biotransformació d'aquests compostos.

En el tercer capítol es recullen els procediments experimentals emprats per a l'estudi dels processos de fotodegradació i processos de biotransformació que s'han realitzat en aquesta tesi.

En el quart capítol es fa una descripció dels mètodes quimiomètrics utilitzats per al tractament de dades dels processos de fotodegradació.

En el cinquè capítol es descriuen detalladament els resultats obtinguts en els treballs que s'han realitzat en aquesta tesi en tres blocs que agrupen treballs que tenen una unitat temàtica. El primer bloc mostra una revisió bibliogràfica dels mètodes quimiomètrics més emprats en l'anàlisi de dades ambientals que involucren contaminants orgànics i es presenta la proposta d'una metodologia de seguiment experimental i tractament quimiomètric per a l'estudi i interpretació de processos de fotodegradació d'aquest tipus de compostos

contaminants orgànics. El segon bloc descriu els estudis dels processos de fotodegradació i biodegradació del producte comercial DecaBDE i la determinació analítica dels fotoproductes formats. Finalment, el tercer bloc presenta els estudis de fotodegradació dels bromofenols mitjançant la metodologia experimental i quimiomètrica proposada en aquesta tesi. Tots tres blocs contenen una petita introducció, un resum breu dels articles científics publicats que es recullen en cadascun dels blocs i una discussió global final dels resultats obtinguts.

Finalment, en el sisè capítol es recull les conclusions generals més importants de la present tesi.

1.3. RELACIÓ DELS TREBALLS CIENTÍFICS PRESENTATS EN LA MEMÒRIA

1- Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review.

Autors: Sílvia Mas, Anna de Juan, Romà Tauler, Alejandro C. Olivieri, Graciela M. Escandar.

Revista: Talanta 80 (2010) 1052.

2- Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes.

Autors: Sílvia Mas, Romà Tauler, Anna de Juan.

Revista: Journal of Chromatography A 1218 (2011) 9260.

3- Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach.

Autors: Sílvia Mas, Anna de Juan, Sílvia Lacorte, Romà Tauler.

Revista: Analytica Chimica Acta 618(2008) 18.

4- *Comprehensive liquid chromatography–ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices.*

Autors: Sílvia Mas, Olga Jáuregui, Fernando Rubio, Anna de Juan, Romà Tauler, Sílvia Lacorte.

Revista: Journal of Mass Spectrometry 2007 (42) 890.

5-. *In vitro metabolism of decabromo diphenyl ether using rat microsomes.*

Autors: Sílvia Mas, Demetrio Raldúa, Anna de Juan, Romà Tauler, Sílvia Lacorte.

Revista: Organohalogen Compounds 70 (2008) 2189.

6- *Comprehensive description of the photodegradation of bromophenols using chromatographic monitoring and chemometric tools.*

Autors: Sílvia Mas, Albert Carbó, Sílvia Lacorte, Anna de Juan, Romà Tauler.

Revista: Talanta 83 (2011) 1134.

7- *Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques.*

Autors: Anusha Jayaraman, Sílvia Mas, Romà Tauler, Anna de Juan.

Revista: Journal of Chromatography B (DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.03.038).

CAPÍTOL 2:

Introducció

2.1. ELS RETARDANTS DE FLAMA BROMATS

Els incendis són una causa significativa de pèrdues de vides humanes i de danys materials. La incidència d'incendis ha disminuït en els últims 30 anys, i en part és degut a les polítiques de prevenció d'incendis, que sovint exigeixen la presència de productes químics retardants de flama (FR) en la manufactura de molts productes industrials.

Hi ha molts tipus de retardants de flama, que es poden agrupar en quatre categories principals segons la seva naturalesa química: els retardants inorgànics, els retardants orgànics que contenen fòsfor, els que contenen nitrogen i els retardants orgànics halogenats [Birnbbaum, 2004]. El grup dels retardants orgànics halogenats pot ser subdividit en classes més petites, de les quals els retardants de flama bromats (BFR) són actualment els més importants a nivell comercial degut al seu baix cost, la seva eficàcia i la seva àmplia aplicació [Troitzsch, 1998]

Definim els retardants de flama bromats (BFR) com compostos químics antropogènics que contenen àtoms de brom en la seva estructura i que s'afegeixen a una gran varietat de productes de consum (ordinadors, mobles, tèxtils, etc.) per tal de millorar-ne la resistència al foc [WHO, 1994]. Els BFR constitueixen al voltant del 40 % del consum total dels retardants de flama (FR), s'han comercialitzat des de 1960 i el seu ús ha augmentat en els últims 20 anys. Actualment, es produeixen diverses classes de BFR, però les principals són: el tetrabromobisfenol A (TBBPA) i altres compostos fenòlics, com els bromofenols (BP), els difenilèters polibromats (PBDE) i l'hexabromociclododecà (HBCD).

En general, els BFR es poden dividir en compostos additius i reactius. D'una banda, els BFR additius (com els PBDE i el HBCD) són simplement barrejats amb un polímer o són incorporats de forma directa en els productes i, per tant, es poden alliberar inalterats al medi ambient. S'ha constatat que aquests compostos es poden bioacumular a la sang, en la llet materna i en teixits grassos dels animals i de l'home, i se sap que poden afectar el desenvolupament del sistema nerviós i causar disrupcions endocrines [Alaee, 2003]. Per contra, els BFR reactius (com el TBBPA) s'uneixen covalentment al producte al qual s'afegeixen i, per tant, no són alliberats al medi ambient tan fàcilment com els BFR additius. A més, els BFR reactius són menys lipòfils i es biodegraden més fàcilment a causa dels seus grups hidroxils (OH^-) [Alaee, 2003]. Els bromofenols, en canvi, no s'utilitzen directament com ignífugs, sinó que s'utilitzen com a intermediaris químics en la síntesi d'altres productes.

Els retardants de flama bromats estudiats en aquesta tesi doctoral són els PBDE i els bromofenols. Per tant, a continuació es farà una descripció més detallada d'aquests compostos.

2.1.1. ELS DIFENILÈTERS POLIBROMATS

2.1.1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Els difenilèters polibromats (PBDE) són una sèrie de compostos aromàtics bromats, amb una estructura bàsica formada per dos anells de benzè units per un àtom d'oxigen. El patró de bromació per a cadascun dels anells pot variar i es coneix un total de 209 congèneres que es divideixen en deu grups d'homòlegs segons el grau de bromació de la molècula (vegeu Figura 2.1). Els

diferents congèneres de PBDE són numerats segons el sistema de la IUPAC, originalment dissenyat per als bifenils policlorats (PCB), degut a la similitud estructural que tenen amb aquests compostos [Ballschmiter, 1993].

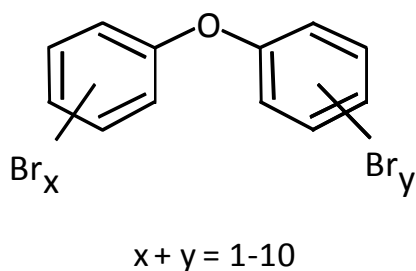


Figura 2.1. Estructura general dels PBDE. x i y indiquen el nombre d'àtoms de brom presents a cada anell.

En la Taula 2.1 es mostren els grups d'homòlegs, les fórmules químiques amb les masses moleculars corresponents, el nombre de congèneres de cada grup homòleg i la nomenclatura dels PBDE.

Taula 2.1. Grups d'homòlegs, fórmules químiques (masses moleculars), nombre de congèneres per a cada grup homòleg i nomenclatura dels PBDE.

Grup homòleg	Fórmula química (massa molecular)	Nombre de congèneres	Nomenclatura
monoBDE	$C_{12}H_9Br_1O$ (249,1)	3	BDE1-BDE3
diBDE	$C_{12}H_8Br_2O$ (328,0)	12	BDE4-BDE15
triBDE	$C_{12}H_7Br_3O$ (406,9)	24	BDE16-BDE39
tetraBDE	$C_{12}H_6Br_4O$ (485,8)	42	BDE40-BDE81
pentaBDE	$C_{12}H_5Br_5O$ (564,7)	46	BDE82-BDE127
hexaBDE	$C_{12}H_4Br_6O$ (643,6)	42	BDE128-BDE169
heptaBDE	$C_{12}H_3Br_7O$ (722,5)	24	BDE170-BDE193
octaBDE	$C_{12}H_2Br_8O$ (801,4)	12	BDE194-BDE205
nonaBDE	$C_{12}H_1Br_9O$ (880,3)	3	BDE206-BDE208
decaBDE	$C_{12}Br_{10}O$ (959,2)	1	BDE209

Els PBDE són compostos bastant estables i semivolàtils amb punts d'ebullició entre 310 i 425 °C i amb pressions de vapor baixes que decreixen en augmentar el grau de bromació [WHO 1994; Tittlemier, 2002]. La posició de l'halogen també influeix en la pressió de vapor, de manera que aquesta és major per als congèneres amb el brom en la posició orto [Wong, 2001]. Aquest caràcter semivolàtil fa que es puguin transportar a llargues distàncies, a més tenen alta afinitat per enllaçar-se a partícules, la qual cosa es reflecteix en els alts nivells d'aquests compostos en sediments, llots residuals i partícules de pols, principalment dels congèneres més bromats com el BDE209. Els congèneres amb menor nombre de broms, com el BDE47 i BDE99, de pressions de vapor més altes, es troben predominantment en l'aire. Altres congèneres, com ara el BDE153, poden existir en ambdues fases [Alaee, 2003; Birnbaum, 2004; Palm, 2002; Hale, 2006; Darnerud, 2001; de Wit, 2002].

Els PBDE són compostos molt lipòfils i només lleugerament solubles en aigua [Tittlemier, 2002]. Presenten coeficients de partició octanol-aigua ($\log K_{ow}$) en l'interval de 5,9-6,2 per als tetraBDE, 6,5-7 per als pentaBDE, 8,4 - 8,9 per als octaBDE i 10 per al decaBDE [WHO, 1994; Ellinger, 2003]. A causa del seu caràcter lipòfil tendeixen a concentrar-se en organismes vius, és a dir, presenten bioacumulació, així com també biomagnificació al llarg de la cadena tròfica fins arribar a l'home [Vives, 2004]. A diferència dels bifenils policlorats (PCB), que són recalcitrants, l'enllaç C-Br és més dèbil que el C-Cl i, per tant, els PBDE poden metabolitzar-se o degradar-se en el medi ambient. En la Taula 2.2, a mode d'exemple, es presenten algunes propietats fisicoquímiques de congèneres representatius dels diferents grups d'homòlegs.

Taula 2.2. Propietats fisicoquímiques d'alguns PBDE [ASTDR, 2004; Cetin, 2005; Tittlemier, 2002].

	$\log K_{ow}^{(a)}$	$P_v^{(b)}$ (mm Hg)	$S_{aigua(25^\circ C)}^{(c)}$ (mg/L)	$H_{25^\circ C}$ (Pa m ³ /mol) ^(d)	T_f (°C) ^(e)
BDE15	5,55	n. d.	0,1	21	57-58
BDE28	5,98	$2,32 \times 10^{-5}$	0,07	5,1	64-64,5
BDE47	6,55	$4,19 \times 10^{-6}$	0,01	1,5	83,5-84,5
BDE99	7,13	$9,57 \times 10^{-7}$	0,009	0,23	90,5-94,5
BDE100	6,86	$2,46 \times 10^{-7}$	0,04	0,069	100-101
BDE153	7,62	$1,35 \times 10^{-8}$	0,0009	0,067	160-163
BDE154	7,39	$5,64 \times 10^{-8}$	0,0009	0,24	131-132,5
BDE183	8,27	$2,69 \times 10^{-9}$	0,001	0,0074	171-173
BDE209	9,97	$1,64 \times 10^{-12}$	$< 0,0001$	0,04	290-306

n. d.: no determinat; (a) $\log K_{ow}$: coeficient de partició octanol-aigua; (b) p_v : pressió de vapor; (c) $S_{aigua(25^\circ C)}$: solubilitat en aigua a 25°C; (d) $H_{25^\circ C}$: constant de Henry (dóna idea de la capacitat que tenen els compostos de passar del medi aquós a l'aire); (e) T_f : temperatura de fusió.

Els PBDE se sintetitzen mitjançant bromació del difenilèter en determinades condicions i, com a resultat, s'obtenen mesclades de PBDE amb diferent grau de bromació. Existeixen bàsicament tres productes comercials principals: la

mescla DecaBDE, la mescla OctaBDE i la mescla PentaBDE, que s'anomenen així degut al seu contingut mitjà de brom. En la Taula 2.3 es donen les composicions generals d'aquests productes. Mentre que la mescla DecaBDE està formada gairebé exclusivament per un únic congènere (BDE209), la PentaBDE té com a principals components tetraBDE i pentaBDE, i l'OctaBDE la constitueixen majoritàriament heptaBDE [la Guardia, 2006]. La PentaBDE és un líquid viscos de color àmbar clar, mentre que la DecaBDE i l'OctaBDE són sòlids blancs.

Taula 2.3. Composicions generals de les principals mescles comercials de PBDE.

Mescla comercial	Proporció de PBDE en els productes comercials (%)							
	triBDE	tetraBDE	pentaBDE	hexaBDE	heptaBDE	octaBDE	nonaBDE	decaBDE
DecaBDE							0,3-3	97-98
OctaBDE				10-12	43-44	31-35	9-11	0-1
PentaBDE	0-1	24-38	50-62	4-8				

Per tal d'evitar confusions de nomenclatura, en aquest text, els noms en majúscules s'utilitzaran per a les mescles comercials (per exemple, la mescla PentaBDE), mentre que els noms en minúscules es referiran als diferents grups d'homòlegs (per exemple, el grup homòleg de pentaBDE format per compostos que únicament tenen cinc broms en l'estructura).

2.1.1.2. PRODUCCIÓ I USOS. PRESÈNCIA I TOXICITAT

La producció dels PBDE es va iniciar a Alemanya en la dècada dels setanta [WHO, 1994; BSEF, 2001]. La demanda global d'aquests retardants al 2001 va ser de 67.500 tones, de les quals el 83 % va correspondre a la mescla DecaBDE, el 11% a la PentaBDE i el 6 % a l'OctaBDE [BSEF, 2001]. Els PBDE són emprats com a additius en polímers i tèxtils i la seva propietat retardant de flama es basa en l'eliminació dels radicals lliures formats durant els processos de combustió [WHO, 1997]. Els seus usos difereixen segons la mescla de la qual es tracti. La mescla PentaBDE és utilitzada en escuma de poliuretà en mobles i tapisseria, l'OctaBDE en acrilonitril butadiè estirè (ABS), en ordinadors, telèfons mòbils, jocs electrònics, televisors i electrodomèstics i la mescla DecaBDE en poliestirè d'alt impacte per a televisors, ordinadors i altres aparells electrònics i en aplicacions tèxtils, en què s'addiciona a la fibra polièster i a recobriments de catifes, seients d'automòbils i avions [ATSDR, 2004].

Els PBDE poden ser alliberats al medi ambient durant la seva producció i durant la seva incorporació a d'altres productes. La seva elevada producció i varietat d'usos, així com les seves propietats fisicoquímiques, fan que els PBDE s'hagin convertit en contaminants ambientals ubics. D'aquesta manera, els PBDE s'han difós en tots els compartiments ambientals (aigua, aire, sòl i biota) i en tota la superfície terrestre [Tanabe, 2004]. Al principi de la dècada dels vuitanta, un estudi realitzat en el Riu Viskan de Suècia va identificar per primera vegada la presència de PBDE en peixos, amb nivells màxims en fetge i múscul de 110 i 27 mg/kg de lípids, respectivament [Andersson, 1981]. Des de llavors la presència de PBDE ha estat detectada en mostres de teixits

humans (llet, sang i teixit adipós) i d'animals, així com en aliments, aire, pols, terra, sediments, aigües i fangs residuals en els Estats Units d' Amèrica, Canadà, Europa, Japó i regions remotes com l'Àrtic, la qual cosa indica el seu ampli abast de transport [Law, 2003; Kazda, 2004; Zheng, 2004; Covaci, 2003; Ikonomou, 2000a; 2002b; de Wit, 2002; de Boer, 2003; Herzke, 2005; Lacorte, 2003; Meneses, 1999; Schure, 2004; Hale, 2001, 2003; Alaei, 2002; Stapleton, 2005; Birnbaum, 2004; Allchin, 1999; Kajiwara, 2004; Scheter, 2003, 2004; Sjödin, 2008; Hites, 2004a, 2004b; Darnerud, 2001; Ohta, 2002]. La preocupació de l'opinió pública i el món científic ha augmentat davant la publicació de dades que indiquen que la concentració de diversos congèneres de PBDE s'ha duplicat cada any des dels últims 25 anys.

No hi ha informació definitiva dels efectes dels PBDE sobre la salut dels éssers humans, però s'han confirmat diversos efectes perjudicials en animals com ratolins i rates. L'exposició a PBDE, abans del naixement o després, va causar problemes en el desenvolupament del cervell de ratolins. Els estudis han descrit problemes d'aprenentatge, de memòria i de comportament [Guill, 2004]. L'exposició a PBDE durant el desenvolupament del fetus pot disminuir els nivells d'hormona tiroide en ratolins, la qual cosa comporta problemes en el desenvolupament general del sistema nerviós [Mazdai, 2003]. Es va veure també que la seva exposició perjudicava el sistema reproductiu, l'eficàcia del sistema immunitari i el fetge en ratolins i rates [Kuriyama, 2005]. S'han descrit també efectes dels PBDE en peixos i invertebrats. En peixos produïa efectes de fetge gras i problemes reproductius [Holms, 1993].

Sembla que els efectes tòxics potencials de les tres mescles comercials de PBDE augmenten en disminuir el grau de bromació. Aquesta diferència en el nivell de toxicitat entre els tres productes està possiblement relacionada amb

les diferències en l'absorció, el metabolisme i l'eliminació dels isòmers de cada mescla [Darnerud, 2003].

No se sap si els PBDE poden produir càncer en éssers humans. Només existeixen estudis de carcinogènesi en animals de laboratori amb la mescla DecaBDE. Aquesta mescla, a dosis altes, provoca un increment en la incidència d'adenomes i carcinomes en la glàndula tiroide dels ratolins i en el fetge i el pàncrees de les rates [Darnerud, 2003]. A conseqüència d'això, l'agència dels Estats Units d'Amèrica per la prevenció i protecció del medi ambient (EPA) ha classificat la mescla DecaBDE en el grup de substàncies amb possibles efectes cancerígens per als humans [EPA IRIS, 2008]. No obstant això, no està ben definida la classificació de les altres mescles o congèneres amb un nombre menor de broms degut a la falta d'estudis.

Les dades sobre la toxicitat dels PBDE són encara escasses i clarament insuficients per a una avaluació correcta dels riscos ambientals i biològics d'aquests compostos. Tot i la manca de dades s'ha vist que presenten activitat de disrupció endocrina i afecten el metabolisme i transport hormonal de la glàndula tiroides. A més, una altra qüestió important a tenir en compte quan es parla de la perillositat dels PBDE és la toxicitat associada als productes de transformació o degradació d'aquests compostos en el medi ambient o als productes generats durant processos de combustió. S'ha descrit que durant aquests processos apareixen altres compostos orgànics bromats, alguns dels quals són potencialment més tòxics que els productes originals com són les dibenzodioxines polibromades (PBDD) i els dibenzofurans polibromats (PBDF).

L'evidència del potencial tòxic dels PBDE i la seva àmplia distribució per tot el planeta va suposar la prohibició de l'ús i producció de les mescles comercials PentaBDE i OctaBDE a Europa [Directiva 2003/11/CE] i als Estats Units d'Amèrica [EPA OPPT, 2008]. A més, recentment, la convenció d'Estocolm sobre contaminants orgànics persistents ha decidit incloure en la seva llista els següents productes: tetraBDE (definit com BDE47), pentaBDE (definit com BDE99), hexaBDE (definit com BDE56, BDE153 i BDE154) i heptaBDE (definit com BDE175 i BDE183) [SCPOPS,2010].

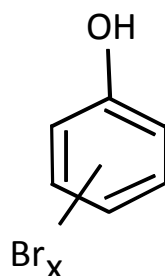
La producció i ús de la mescla DecaBDE és encara vigent. No obstant això, a Europa existeixen certes limitacions en el seu ús derivades de la directiva de restriccions de substàncies perilloses en equipaments elèctrics i electrònics [Bureau, 2010; Directiva 2002/95/EC]. A més, es troba dins de les substàncies i preparats químics que poden estar subjectes a un sistema d'autorització segons la directiva REACH (*Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) [Reglament (CE) n° 1907/2006]. També hi ha en marxa algunes iniciatives voluntàries per part d'alguns països i empreses amb la finalitat de suprimir l'ús, consum i producció del DecaBDE.

Malgrat la seva prohibició o les seves restriccions, aquestes substàncies segueixen presents en un important nombre de productes encara en circulació, per tant continuaran alliberant-se al llarg de la vida útil del producte. A més, la mescla DecaBDE, encara en ús, en degradar-se pot donar congèneres amb un nombre menor de broms, potencialment més tòxics i actualment prohibits. Això crea la necessitat de tenir un major coneixement dels processos de degradació i de la identificació dels subproductes formats i és per aquest motiu que en la present memòria s'ha estudiat la degradació d'aquesta mescla.

2.1.2. ELS BROMOFENOLS

2.1.2.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Els bromofenols constitueixen una sèrie de compostos formats per un esquelet fenòlic i un nombre variat d'àtoms de brom (Figura 2.2). La diversitat de congèneres segons el grau de bromació es gran i es poden tenir fins a 19 bromofenols diferents, que es divideixen en cinc grups d'homòlegs segons el grau de bromació, que va des dels monobromofenols fins al pentabromofenol.



$$x = 1-5$$

Figura 2.2. Estructura general dels bromofenols.

En la Taula 2.4 es mostren els grups d'homòlegs, les fórmules químiques amb els pesos moleculars corresponents, el nombre de congèneres i els congèneres de cada grup homòleg amb les abreviacions utilitzades en la present memòria.

Taula 2.4. Grup d'homòlegs, fórmules químiques (masses moleculars), nombre de congèneres i congèneres per a cada grup homòleg amb les abreviacions utilitzades en la present memòria pels bromofenols.

Grup homòleg	Fórmula química (massa molecular)	Nombre de congèneres	Congèneres (abreviacions)
monoBP	C ₆ H ₅ Br ₁ O (173,0)	3	2, 3, 4BP
diBP	C ₆ H ₄ Br ₂ O (251,9)	6	23, 24, 25, 26, 34, 35DBP
triBP	C ₆ H ₃ Br ₃ O (330,8)	6	234, 235, 236, 245, 246, 345TBP
tetraBP	C ₆ H ₂ Br ₄ O (409,6)	3	2345, 2346, 2356TeBP
pentaBP	C ₆ HBr ₅ O (488,6)	1	PBP

Les propietats fisicoquímiques dels bromofenols, de manera similar als PBDE, varien segons el grau de bromació i la posició dels broms en l'estructura molecular [Rayne, 2009]. A mesura que augmenta el grau de bromació, hi ha una disminució en la solubilitat i en la pressió de vapor. Per tant, els compostos més lleugers, els menys bromats, tenen tendència a dissoldre's en aigua. En canvi, el pentabromofenol té tendència a adsorbir-se en les partícules sòlides en suspensió i en els sediments, en els quals queda fortament retingut.

Els compostos menys bromats poden considerar-se relativament volàtils, mentre que els més bromats no presenten tendència a la volatilització. A més, els bromofenols amb un major nombre de broms presenten uns valors de coeficient de partició octanol-aigua ($\log K_{ow}$) relativament alts i, per tant, es poden considerar compostos lipòfils, encara que presentin una solubilitat en l'aigua relativament alta (vegeu Taula 2.5). Ambdues característiques afavoreixen la seva distribució en el medi ambient.

Altres propietats estructurals dels bromofenols, com l'enllaç de pont d'hidrogen intramolecular entre el grup fenol i el brom en posició *orto* i les interaccions electrostàtiques, influeixen fortament en el comportament químic d'aquests compostos [Han, 2005].

Els bromofenols són compostos difícilment degradables i, per tant, quan s'alliberen queden retinguts en el medi ambient. Malgrat això, alguns microorganismes molt especialitzats poden ser capaços de degradar-los i també la llum dels raigs solars. A la taula 2.5 es mostra un resum de certes característiques fisicoquímiques d'alguns d'aquests compostos.

Taula 2.5. Propietats fisicoquímiques d'alguns bromofenols [TOXNET, 2009].

	$\text{Log}K_{\text{ow}}^{(a)}$	$P_v^{(b)}$ (mm Hg)	$S_{\text{aigua}(25^\circ\text{C})}^{(c)}$ (mg/L)	$H_{25^\circ\text{C}}$ (Pa m ³ /mol) ^(d)	T_f (°C) ^(e)
2BP	2,35	28,35	2230	3,62	5,6
3BP	2,63	15,2	23000	2,14	33
4BP	2,59	8,89	14000	1,47	66,4
24DBP	3,22	1,02	1900	0,87	38
26TBP	3,36	0,78	119	0,86	56,4
246TiBP	4,13	0,23	70	0,44	94-96
2346TeBP	5,07	$5,09 \times 10^{-3}$	1,98	0,14	113,5
PBP	5,96	$2,92 \times 10^{-4}$	0,02	0,05	229,5

n. d.: no determinat; (a) $\text{Log}K_{\text{ow}}$: coeficient de partició octanol-aigua; (b) P_v : pressió de vapor; (c) $S_{\text{aigua}(25^\circ\text{C})}$: solubilitat en aigua a 25°C; (d) $H_{25^\circ\text{C}}$: constant de Henry (dóna idea de la capacitat que tenen els compostos de passar del medi aquós a l'aire); (e) T_f : temperatura de fusió.

2.1.2.2. PRODUCCIÓ I USOS. PRESÈNCIA I TOXICITAT

Els bromofenols són compostos químics que poden tenir origen natural o antropogènic, per bé que aquest últim és el més habitual. El 246TBP és el bromofenol que presenta el major volum de producció a nivell mundial. En el 2001, el volum de producció mundial del 246TBP es va estimar en 9.500

tones/any aproximadament [IUCLID, 2003]. També es produeixen en grans quantitats 24DBP i PBP però en menor proporció que el 246TBP.

La principal utilització dels bromofenols es produeix en la indústria dels retardants de flama, però no s'utilitzen directament com retardants de flama, sinó més aviat com a reactius en la síntesi d'altres productes com les resines epoxibromades. S'utilitzen també com a conservadors de la fusta o com a desinfectants. Compostos com el 26DBP i el 246TBP poden formar-se com a subproductes en els processos de descomposició de materials plàstics que contenen tetrabromobisfenol A (TBBPA) [de Wit, 2002; Voordeckers, 2002]. També es generen bromofenols a partir de la combustió de materials halogenats, de la torba i del combustible amb plom dels vehicles [Müller, 1986]. A més, s'ha descobert que es poden generar a partir de processos de cloració d'aigües amb productes amb continguts elevats de brom [Sweetman, 1980].

Ara bé, tal i com s'ha esmentat anteriorment, no tota la presència de bromofenols en el medi ambient es deu a causes antropogèniques, sinó que aquestes compostos també es troben de forma natural. Algunes espècies d'algues tenen alts continguts de bromofenols senzills. A més, també és conegut que alguns cucs (*Enteropneusta*) produeixen i excreten grans quantitats de bromofenols sense tenir cap font d'alimentació evident d'aquests compostos [Higa, 1980]. Els bromofenols "catalogats" com a naturals són el 4BP, 24DBP, 26DBP i el 246TBP. Aquests compostos són habituals en hàbitats marins on es troba la flora i la fauna que produeixen aquestes substàncies [Flodin, 1999, 2000].

Els bromofenols poden ser alliberats a l'ambient durant la seva producció i durant la seva incorporació a productes. A més, grans quantitats de

bromofenols també poden ser alliberades mitjançant fonts naturals i a través de la degradació d'altres contaminants. Tenint en compte tot això i les seves propietats fícoquímiques, els bromofenols es poden trobar potencialment en els diferents compartiments ambientals, tals com aire, aigua, sediment, fang, així com en mostres d'aire, pols, biota i teixits humans. No obstant això, existeixen molt poques dades sobre la presència d'aquests compostos en el medi ambient.

Generalment, la presència de 2BP, 4BP, 24DBP, 26DBP i triBP es relaciona amb els processos de tractament potabilitzador de l'aigua. La seva determinació també resulta d'interès si considerem que són els responsables del sabor a plàstic que presenten les aigües de consum clorades [Acero, 2005]. En concret, el llindar de sabor es troba en 0,5 ng/L per al 26DBP.

Pel que fa als compartiments ambientals, s'han arribat a trobar concentracions en aigües superficials de 40, 3 i 0,3 ng/mL per als 24DBP, 26DBP i 246TBP, respectivament. Les concentracions més elevades, però, s'han trobat en sediments on s'han detectat valors de fins a 3690 µg/kg de 246TBP [Howe, 2005].

Hi ha poques dades sobre la toxicitat dels bromofenols i aquestes no evidencien una clara perillositat per a l'espècie humana. Tot i això, els estudis fets fins ara indiquen que sí que tenen efectes nocius sobre els éssers vius. En rates exposades als bromofenols s'ha vist que aquests compostos a dosis baixes causen un augment de pes en el fetge, de la concentració de proteïnes i de la salivació, mentre que a dosis altes provoquen problemes en la reproducció [TOXNET, 2009]. Altres estudis confirmen que els bromofenols són compostos que pertanyen a la llista de disruptors endocrins [Hassenklöver,

2006]. També s'han comprovat problemes nefrotòxics associats a diversos compostos [Szymanska, 1995; Lau, 1984].

Un altre tema que preocupa és la toxicitat dels possibles productes de degradació que es puguin formar. Es creu que es formen anells aromàtics de 6 carbonis substituïts per alcohols, cetones o grups carboxílics [Burrows, 2002]. Els productes formats a partir de la degradació dels bromofenols poden ser molt diversos i per tant, es difícil fer-ne una valoració global de la toxicitat.

Tot i la limitada informació sobre els bromofenols, alguns d'ells com el 24DBP, el 26DBP, els triBP i el PBP estan inclosos en la llista de substàncies tòxiques de l'EPA (de l'anglès *Master Testing List*, *MTL*) [NICNAS, 2001]. A més, el 24DBP, el 246TBP i el PBP es troben en la llista de les substàncies i preparats químics que poden estar subjectes a un sistema d'avaluació segons la directiva REACH [Reglament (CE) n° 1907/2006].

2.2. MECANISMES DE DEGRADACIÓ DELS RETARDANTS DE FLAMA

Quan els retardants de flama bromats són alliberats en el medi ambient, poden patir diferents transformacions que són resultat de processos químics, físics o biològics [Holt, 2000; Dabrowska, 2005]. En la Figura 2.3 es mostren alguns d'aquests processos.

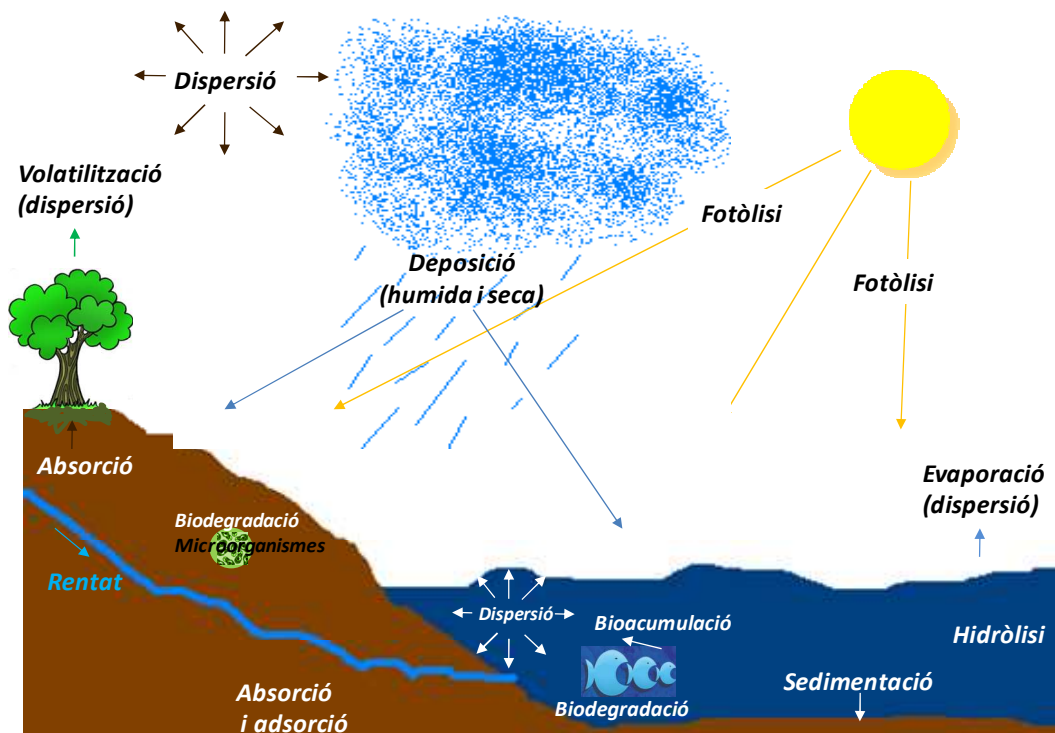


Figura 2.3. Processos que pateixen els retardants de flama bromats en el medi ambient.

Per exemple, un retardant de flama alliberat en el medi ambient es pot dipositar sobre el sòl o els vegetals. Una part del contaminant pot ser absorbida per les plantes i l'altra part pot ser absorbida o adsorbida pels constituents del sòl. La fracció de la substància que queda en la superfície dels

vegetals i del sòl sense reaccionar químicament pot ser dissolta o arrossegada per l'aigua de la pluja cap al mar (rentat). Una cop en el medi aquós, el compost pot precipitar en el fons marí o dels rius i llacs (sedimentació), acumular-se en les capes profundes de sediments i d'aquesta manera dificultar la seva degradació. Part de la substància dipositada en els vegetals i en el sòl i part de la que és dissolta o arrastrada per l'aigua és ingerida pels éssers vius (bioacumulació). A més, el contaminant també pot passar del medi aquós, de la superfície de les plantes i inclús de la superfície del sòl a l'aire (volatilització, evaporació).

Per tant, els diferents processos químics, físics o biològics que pateixen els retardants de flama bromats en determinaran el destí i el comportament en el medi ambient. Els processos físics i algun biològic afecten, fonamentalment, al transport d'aquests compostos (volatilització, dispersió, deposició, sedimentació, absorció, adsorció, bioacumulació...) i en determinen la distribució temporal i espacial. Els processos químics i biològics impliquen reaccions de transformació mitjançant biodegradació, fotòlisi i degradació química (especiació, hidròlisi...). La biodegradació i la fotodegradació són els processos principals pels quals es produeix una eliminació natural dels contaminants en el medi ambient [Dabrowska, 2004] i, per tant, són de gran importància a l'hora d'avaluar la persistència d'un compost químic.

La velocitat i el mecanisme d'aquests processos dependrà del tipus de compost (la reactivitat intrínseca deguda a les seves propietats fisicoquímiques) i de la matriu en què es trobi (aigua, sòl, etc), així com de diversos factors mediambientals (temperatura, intensitat de la llum, etc.). La combinació dels factors esmentats determinarà l'evolució i transformació del contaminant en el medi ambient. Sovint, els productes generats en aquestes transformacions

poden ser més perjudicials per al medi ambient i, finalment, per a l'home, que el producte original.

Per aquestes raons, és necessari estudiar la degradació dels contaminants en el medi ambient, la qual cosa implica conèixer la seva persistència i la identitat i mecanisme associat a la formació de llurs productes de degradació, que és un dels objectius de la present memòria. En aquesta tesi s'estudiaran els processos de fotodegradació i biodegradació d'alguns difenilèters polibromats i bromofenols.

2.2.1. ESTUDIS DE FOTODEGRADACIÓ

Característiques generals

La fotodegradació, segons la definició de la IUPAC, és la transformació fotoquímica d'una molècula en fragments de menor massa molecular, en general ; durant un procés d'oxidació [IUPAC, 1996]. En un sentit més ampli, parlar de fotodegradació es refereix a tota transformació del producte original (en compostos més o menys pesats i mitjançant diferents tipus de reaccions) induïda per l'exposició a una font de radiació. Les transformacions fotoquímiques són reaccions químiques causades per l'absorció de la llum. La regió ultraviolada de l'espectre electromagnètic és la font d'energia principal per a les fotoreaccions. El sol és la font de radiació natural més important i el seu espectre electromagnètic cobreix l'interval de longituds d'ona entre 290 i 3000 nm. Aquest espectre es classifica en tres regions: radiació ultraviolada (UV), visible (Vis) i infraroig (IR). La radiació UV es subdivideix en tres regions: A, B i C. La distribució de la intensitat de radiació solar és del 10 % de radiació ultraviolada, prop del 50 % de radiació visible i el 40 % de radiació

infraroja [Dabrowska, 2004]. En la taula 2.6 s'observen les regions de l'espectre de la radiació solar.

Taula 2.6. Regions de l'espectre de la radiació solar.

Regió	Longitud d'ona (λ) nm
Infraroig	> 700
Visible	400-700
Ultraviolat A (UVA)	320-400
Ultraviolat B (UVB)	290-320
Ultraviolat C (UVC)	200-290

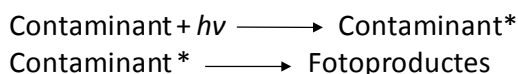
La fotodegradació d'un contaminant en el medi ambient pot tenir lloc en l'atmosfera, en la superfície del sol i en l'aigua. Un dels factors que condicionen aquest procés és la intensitat de la radiació de la llum solar que, al seu torn, depèn de l'època de l'any, l'hora del dia, la latitud, l'altura sobre el nivell del mar, la presència de núvols, la mida del forat de la capa d'ozó, etc.

A escala de laboratori hi ha diversos tipus de fonts de radiació policromàtiques i monocromàtiques (làmpada de Xenó, de vapor de mercuri, de deuteri) que simulen la llum solar. Les làmpades de vapor de mercuri són les més utilitzades en els estudis de fotòlisi. Les fonts de radiació utilitzades en aquesta tesi són una làmpada de vapor de mercuri monocromàtica que emet llum ultraviolada fonamentalment a 245 nm i una cambra de reacció amb una font de radiació policromàtica que simula la llum solar.

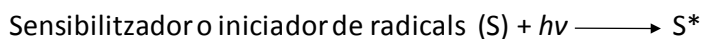
Cal remarcar que hi ha dos tipus de processos en les reaccions fotoquímiques: la fotòlisi directa i la fotòlisi indirecta (vegeu Figura 2.4). La fototransformació d'un compost en el medi o laboratori pot resultar de

l'absorció de llum per part del contaminant (fotodegradació directa) o pot ser fotoinduïda (fotodegradació indirecta), a través d'una reacció amb radicals hidroxil (OH^\cdot), ozó (O_3) o nitrats (NO_3^-), que són els agents oxidants presents en l'atmosfera [Hutzinger, 1980; Burrows, 2002]. En el medi ambient (i en certs casos en laboratori) aquests dos mecanismes de fotodegradació es produeixen simultàniament. A més, la presència de microorganismes, algues o substàncies húmiques acceleren les reaccions fotoquímiques perquè són entitats capaces d'absorbir la llum del sol [Zeep, 1983].

Fotodegradació directa



Fotodegradació indirecta



1. $\begin{aligned}\text{S}^* + \text{Contaminant} &\longrightarrow \text{Contaminant}^* + \text{S} \\ \text{Contaminant}^* &\longrightarrow \text{Fotoproductes}\end{aligned}$
2. $\begin{aligned}\text{Sr}^* + \text{Contaminant} &\longrightarrow \text{Contaminant}^\bullet + \text{S}^\bullet \\ \text{Contaminant}^\bullet &\longrightarrow \text{Fotoproductes}\end{aligned}$

Figura 2.4. Mecanismes de reacció de la fotodegradació directa i indirecta.

La possibilitat de fotodegradació d'un compost orgànic en el medi ambient o en laboratori depèn del grau de solapament entre el seu espectre d'absorció UV-Vis i l'espectre d'emissió de la llum del sol o de la font de radiació. Els diferents efectes de la radiació UV inclouen la transformació de compostos

orgànics en altres substàncies orgàniques [Dabrowska, 2004]. A més, la radiació UV indueix la dissociació de compostos presents en el medi amb oxigen i la formació de radicals altament reactius que són capaços de degradar contaminants orgànics (fotodegradació indirecta).

El procés de fotodegradació directa s'inicia quan la molècula absorbeix un quàntum d'energia (fotó) i, com a resultat, es produeix una transició electrònica i la molècula passa a un estat de major energia o excitat (*). Si l'energia de la llum UV absorbida és més gran que l'energia d'enllaç, l'enllaç químic es pot trencar i pot comportar la formació de radicals més reactius. L'estructura de la molècula determinarà si aquesta és capaç d'absorbir un tipus de radiació i incrementar la seva energia de manera que passi a un estat excitat que en comportarà potser el trencament de l'enllaç, i per tant, la degradació.

Sovint, la fotodegradació d'un compost parental es descriu mitjançant una equació cinètica de primer ordre [Dabrowska, 2005]. Les cinètiques de degradació de primer ordre s'expressen de la següent manera.

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Equació 2.1}$$

on C és la concentració del compost degradat en el temps i k és la constant de velocitat aparent de la fotodegradació (1r ordre).

La integració d'aquesta equació ens proporciona els valors de la concentració del compost parental en funció del temps:

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad \text{Equació 2.2}$$

On C_0 és la concentració inicial del compost ($t=0$ min).

L'equació 2.2 també es pot expressar de la següent manera:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - kt \quad \text{Equació 2.3}$$

A l'hora de comparar cinètiques de fotodegradació, també s'utilitza el temps de vida mitjana ($t_{1/2}$) que és un paràmetre més intuïtiu. Aquest es defineix com el temps que triga la concentració inicial d'una molècula a reduir-se a la meitat de la concentració inicial. Així a partir de l'equació 2.3.

$$C = C_0 / 2$$

$$\ln (C_0 / 2) = \ln C_0 - k t_{1/2}$$

$$\ln C_0 - \ln 2 = \ln C_0 - k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad \text{Equació 2.4}$$

Si bé aquesta és una forma senzilla de descriure la degradació d'un compost, cal dir que sovint el compost es degrada mitjançant esquemes de reacció que inclouen reaccions paral·leles de segon ordre o superior i, per tant, aquesta expressió és una simplificació del mecanisme real. Cal limitar-ne l'ús a estudis en què el coneixement del ritme de desaparició del compost parental sigui l'únic objectiu.

Els retardants de flama bromats, objectiu d'estudi de la present memòria, són susceptibles a la fototransformació, ja que les seves estructures contenen grups

cromòfors que absorbeixen la llum a longituds d'ona en la regió d'UV i Vis de l'espectre solar. La fotodegradació d'aquests compostos pot generar productes de transformació amb una toxicitat superior a la dels compostos parentals. Això explica la importància de conèixer el comportament fotoquímic d'aquests compostos. El següent apartat inclou una revisió bibliogràfica dels estudis de fotodegradació d'aquests tipus de retardants de flama.

2.2.1.1. ESTUDIS DE FOTODEGRADACIÓ DELS DIFENILÈTERS POLIBROMATS. ANTECEDENTS

La fotòlisi és un mecanisme potencial de transformació abiòtica dels PBDE en el medi ambient i ha estat estudiada en gran varietat de condicions (vegeu la Taula 2.7). No obstant això, en molts casos, la informació sobre la identitat i l'estructura dels congèneres específics que es formen és molt limitada, així com la informació de la cinètica i el mecanisme de fotodegradació.

Diversos autors han investigat la fotodegradació de congèneres individuals, principalment la fotodegradació del decabromodifenilèter, el BDE209, o la mescla comercial DecaBDE que conté el 97-98 % d'aquest congènere. La majoria dels treballs s'han realitzat en diversos dissolvents orgànics i mescles i pocs en aigua. També s'han realitzats estudis en sòls, sorra, sediments, pols de casa i d'automòbil i en plàstics.

La fotodegradació del BDE209 (o del producte comercial DecaBDE) va ser estudiada per primera vegada als finals dels vuitanta per Watanabe i Tatsukawa [Watanabe, 1987]. En aquest estudi es va observar la formació de fotoproductes de desbromació com a productes majoritaris. A més, també van identificar com a productes de fotodegradació els dibenzofurans polibromats

(PBDF), així com benzens tetra- i pentabromats. Posteriorment, els diferents estudis sobre la fotodegradació d'aquest congènere han confirmat que el seu principal mecanisme de degradació fotoquímica és la desbromació reductora (amb pèrdua consecutiva de broms) [Ohta, 2001; Bezares-Cruz, 2004; Barcellós de Rosa, 2003; Hua, 2003; Stapleton, 2008; Ahn, 2006; Lagalante, 2011; Hagberg, 2006; Kajiware, 2008, Christiansson, 2009; Söderström, 2004]. Alguns d'aquests estudis també van detectar la formació de dibenzofurans polibromats (PBDF) com a productes de fotodegradació [Hagberg, 2006; Kajiware, 2008, Christiansson, 2009; Söderström, 2004] i pocs treballs observen la formació d'altres compostos orgànics [Christiansson, 2009].

Pel que fa a la cinètica de fotodegradació, s'ha proposat que el procés de fotodegradació del BDE209 (o de la mescla comercial DecaBDE) es pot descriure mitjançant equacions de primer ordre [Bezares-Cruz, 2004; Barcellós de Rosa, 2003; Ahn, 2006; Stapleton, 2008; Shih, 2009; Kajiware, 2008]. Per altra banda, diversos autors que han investigat el procés de fotodegradació d'aquest congènere en diferents matrius no han detectat efectes de matriu en la identitat dels seus productes de fotodegradació, però sí en la seva velocitat de degradació [Hua, 2003; Söderström, 2004; Ahn, 2006; Xie 2009]. En altres treballs es van estudiar l'efecte de la intensitat de la llum i el de l'interval de longituds d'ona de la radiació en la velocitat de degradació [Shih, 2009; Bezares-Cruz 2004]. Els resultats mostren que com més intensa sigui la radiació i més a prop estigui de la zona de l'UVB més augmenta la velocitat de degradació. A més, també es va observar que les constants de formació dels nonaBDE, a partir del congènere decabromat, augmenten en l'ordre *orto* < *meta* < *para*.

Referent a estudis d'altres congèneres, s'ha observat també la desbromació reductora com a principal mecanisme de fotodegradació i la formació de PBDF i altres compostos orgànics com a productes de fotodegradació [Rayne, 2003, 2006; Eriksson, 2004a; Fang, 2008; Sánchez-Prado, 2005a, 2005b]. S'ha observat que la velocitat de degradació dels PBDE sembla ser dependent del grau de bromació, de manera que els PBDE que contenen menor nombre d'àtoms de brom es fotodegraden més lentament que els que en tenen un nombre major [Eriksson, 2004a]. A més, s'ha observat també que els PBDE menys bromats amb broms en posició para es degraden més ràpid que els que en tenen en posició *orto*.

En general, tots els autors han descrit que la desbromació reductora és el principal mecanisme de fotodegradació dels PBDE i només alguns han detectat la formació de PBDF i altres compostos orgànics bromats. A més, la majoria dels autors observen cinètiques de primer ordre i veuen com la velocitat de la degradació depèn de diversos factors com la matriu en què es troben els PBDE, el grau de bromació, la intensitat de la llum, etc.

És important conèixer el comportament fotoquímic d'aquest tipus de compostos, les seves cinètiques i la identitat dels fotoproductes en què es transformen, ja que aquests podrien tenir unes propietats biològiques i toxicològiques completament diferents als compostos originals. En aquesta tesi, s'ha estudiat la fotodegradació del producte comercial DecaBDE, utilitzant llum UV (254 nm) mitjançant espectroscòpia, cromatografia i mètodes quimiomètrics. Gràcies als mètodes quimiomètrics s'ha pogut detectar un gran nombre de fotoproductes i a més establir les cinètiques successives de fotodegradació del DecaBDE.

Taula 2.7. Estudis de fotodegradació dels PBDE.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Conclusions
[Watanabe, 1987]	DecaBDE en hexà:benzè:acetona.	Llum UV (254 nm) i llum solar simulada.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en GC-ECD.	GC-MS	Desbromació reductora, de tri- a octaBDE, formació de PBDF benzens tetra- i pentabromats.
[Ohta, 2001]	DecaBDE en toluè i toluè:EtOH:H ₂ O.	Llum UV (254 nm) i llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic.	GC-ECD	Descomposició ràpida en toluè sota llum UV. Identificació de congèneres amb menor nombre de broms.
[Hua, 2003]	DecaBDE en quars, sílice, sorra amb àcids húmics.	Llum UV (300-350 nm) i llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en HPLC-UV	HPLC-UV i cromatografia iònica	La velocitat de degradació augmenta amb la presència de substàncies húmiques. Postulen fotoproductes de desbromació.
[Barcellós de Rosa, 2003]	DecaBDE en toluè.	Llum solar simulada.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la <i>k</i>).	GC-FID	Cinètiques de primer ordre. Detecció d'hexa- a nonaBDE i van observar altres fotoproductes no identificats.
[Bezares-Cruz, 2004]	DecaBDE en hexà.	Llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en GC-ECD (càlcul de la <i>k</i>).	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. La <i>k</i> depèn de la intensitat de la llum. Desbromació reductora, es van observar més de 40 PBDE de tri- a nonaBDE.
[Söderström, 2004]	DecaBDE en toluè, gel de sílice, sorra, sòl, sediment.	Llum UV (254 nm) i llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de balanços de matèria i <i>t</i> _{1/2}).	GC-MS	El <i>t</i> _{1/2} depèn de la matriu. En toluè i gel de sílice (> 15 min) i en matrius naturals (40-200 h). Es formen PBDE menys bromats (de nona- a triBDE). En les matrius naturals s'identifiquen PBDF.
[Ahn, 2006]	BDE209 en minerals argilosos, òxids metàl·lics, sediments.	Llum UV (300-400 nm) i llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en HPLC-UV (càlcul de la <i>k</i>).	GC-ECD	Cinètiques de primer ordre. La fotodegradació més ràpida amb llum UV (intensitat més alta) i en els minerals argilosos (dèbils interaccions) Fotoproductes de desbromació.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Conclusions
[Hagberg, 2006]	DecaBDE en toluè.	Llum UV (250-400 nm).	---	GC-MS	S'han detectat 27 PBDF de mono- a hexaBDFs.
[Stapleton, 2008]	BDE209 en pols natural i artificial.	Llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k i $t_{1/2}$).	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. Fotoproductes de desbromació (nona- a heptaBDE).
[Kajiwara, 2008]	DecaBDE en plàstics (carcassa de TV i poliestirè d'alt impacte).	Llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul del $t_{1/2}$).	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. En poliestirè d'alt impacte $t_{1/2} = 51$ dies i com fotoproductes d'octa- a nonaBDE i PBDF. En carcassa de TV la degradació és insignificant (additius plàstics que absorbeixen la radiació UV) però s'identifiquen PBDF.
[Shih, 2009]	BDE209 en hexà a diferents concentracions.	Lum UVB (300-330 nm), Llum UVA (350-400nm) i Llum UV (300-400 nm)	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k).	GC-ECD	Cinètiques de pseudoprimer ordre. Pèrdua consecutiva d'àtoms de brom. La fotòlisi més ràpida amb UVB, a més intensitat de la llum i amb més broms en l'estructura. Les constants de formació dels nonaBDE augmenten en l'ordre <i>orto</i> < <i>meta</i> < <i>para</i> . La concentració inicial no influeix en la velocitat.
[Xie, 2009]	BDE209 en THF, isopropanol, EtOH, MeOH, DMSO, acetona i ACN.	Llum UV (365 nm)	Mitjançant disminució d'àrees de pics en HPLC-UV (càlcul de la k).	GC-MS	L'ordre de la velocitat de fotodegradació amb el sovent és: THF > EtOH > DMSO > Isopropanol > ACN > MeOH > Acetona. S'identifiquen fotoproductes de desbromació i en ACN es van detectar altres compostos orgànics no identificats.
[Christiansson, 2009]	BDE209 , en THF, MeOH MeOH:H ₂ O.	Llum UV	---	GC-MS	S'identifiquen d'hexa- a nonaBDE i 23 PBDF (de mono- a pentaBDF). En MeOH s'identifiquen de tetra- a pentaBDF metoxilats. La fotòlisi és més ràpida en THF i més lenta en MeOH:H ₂ O.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Conclusions
[Lagalante, 2011]	BDE209 en sulfat de sodi i en pols d'automòbil.	Llum UV (365 nm).	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k i $t_{1/2}$).	GC-MS	En pols d'automòbil no s'observa una fotodegradació significant. Quantifiquen 21 PBDE (de nona- a penta- i en menor quantitat altres PBDE de menor grau de bromació). Proposen mecanisme
[Rayne, 2003]	BDE15 en MeOH, ACN, ACN:H ₂ O.	Llum UV (300 nm).	Mitjançant disminució d'àrees de pic en GC-MS (càlcul de la k).	GC-MS ¹ H-NMR	La velocitat de degradació depèn de la capacitat de formar ponts d'hidrogen del solvent. El BDE15 es fotodegrada mitjançant desbromació reductora per donar BDE3 i difenilèter
Eriksson, 2004a]	15 PBDE (de deca- a tetraBDE) en MeOH, THF, MeOH:H ₂ O.	Llum UV.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en HPLC-UV. (càlcul de la k).	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. Els PBDE més bromats i amb un anell completament bromat es degraden més ràpid. La velocitat de degradació: THF > MeOH > MeOH:H ₂ O. Desbromació i s'identifiquen PBDF.
[Palm, 2004]	diversos PBDE en THF i en suspensió aquosa.	Llum solar simulada.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en HPLC-UV.	GC-MS	Van observar una pèrdua consecutiva d'àtoms de brom fins la molècula de difenilèter. Identificació de PBDF com a fotoproductes del BDE209
[Sánchez-Prado, 2005a]	BDE47, BDE100, BDE99, BDE153, BDE154 en SPME.	Llum UV (254 nm) a diferents intensitats.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k).	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. La velocitat de la fotodegradació depèn de la intensitat de la radiació i del nombre de broms. La desbromació reductora és el principal mecanisme de fotodegradació. S'han identificat 21 PBDE (de penta- a monoBDE) i PBDF
[Sánchez-Prado, 2005b]	BDE47, BDE100, BDE99, BDE153, BDE154 en SPME i aigua.	Llum solar natural i artificial.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k i $t_{1/2}$).	GC-MS	Els PBDE menys bromats es fotodegraden més lentament. La posició dels broms també influeix en la fotodegradació. En aigua la k ↑ i el $t_{1/2}$ ↓. La desbromació reductora és el principal mecanisme de fotodegradació. S'han identificat 26 PBDE i 2 PBDF. Proposen mecanismes de fotodegradació

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Conclusions
[Rayne, 2006]	BDE 153 en ACN, Aigua i aigua de mar.	Llum UV (302 nm), llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul de la k).	GC-MS	Cinètiques de pseudo-primer ordre. Velocitat de degradació ACN > aigua. S'obtenen majoritàriament BDE 99, BDE 101 i BDE 118; BDE47, BDE77, BDE66 i BDE49, En ACN, a més s'observa de a pentaBDF i tres tetraBDE hidroxilats.
[Kuivikko, 2007]	BDE47, BDE99 i BDE209 en isoctà.	Llum solar natural durant les 4 estacions de l'any.	Mitjançant disminució d'àrees de pic en GC-MS (càlcul de la $t_{1/2}$).	-----	Cinètiques de primer ordre. La velocitat de la fotodegradació augmenta amb el grau de bromació. BDE209 ($t_{1/2} = 0,6$ h), BDE99 ($t_{1/2} = 34$ h) i BDE47 ($t_{1/2} = 204$ h). La fotodegradació és menor en la costa que a l'oceà obert. S'observa com els components, la profunditat i la intensitat de la llum solar són paràmetres que influeixen en la fotodegradació.
[Fang, 2008]	BDE28, BDE47, BDE49, BDE99, BDE100, BDE153, BDE183 en hexà.	Llum UV (làmpada de mercuri > 290 nm).	Mitjançant disminució d'àrees de pic en GC- μ ECD (càlcul de la k).	GC-MS	Cinètiques de pseudo-primer ordre. Els PBDE menys bromats es fotodegraden més lentament. Els PBDE menys bromats en posició <i>para</i> es degraden més ràpid que en posició orto. La desbromació reductora és el principal mecanisme de degradació. S'identifiquen PBDF.
[Li, 2008]	BDE47 en aigua i solucions surfactants en diferents pHs i proporció de cations.	Llum UV (254 nm).	Mitjançant disminució d'àrees de pic (Càlcul del $\phi^{(a)}$ i de la k).	GC-MS	Cinètiques de pseudo-primer ordre. La fotodegradació en solucions surfactants és més ràpida. Desbromació reductiva (de tri a octaBDE) i formació de PBDF. En les solucions surfactants el pH inicial i la presència de cations influeix en la velocitat de fotodegradació.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Conclusions
[Davis, 2009]	BDE206, BDE207 i BDE208 en toluè, THF i MeOH.	Llum solar natural.	Mitjançant disminució d'àrees de pic.	GC-MS	Cinètiques de primer ordre. La velocitat de fotodegradació és més gran en toluè i en THF i MeOH és similar. BDE207 és el que es fotodegrada més ràpid i BDE206 el més lent. Fotoproductes de desbromació (d'octa- a heptaBDE). El solvent no influeix en els fotoproductes.

^(a) $\phi_k = k_\lambda / 2,303 E_\lambda \epsilon_\lambda$. k_λ es la constant cinètica de degradació a una determinada λ ; E_λ és l'energia emesa per la font de radiació; ϵ_λ és el coeficient d'absorció del compost a la λ considerada i ϕ_k és el rendiment quàntic a la λ considerada). Aquesta expressió dóna idea sobre l'eficàcia de la fotodegradació directa [Kari, 1995].

2.2.1.2. ESTUDIS DE FOTODEGRADACIÓ DELS BROMOFENOLS. ANTECEDENTS

A diferència dels estudis amb els PBDE, s'ha trobat que existeixen pocs estudis publicats sobre la fotodegradació dels bromofenols. Els resultats d'alguns d'aquests estudis es mostren resumits en la Taula 2.8. Com es pot veure en aquesta taula, els estudis de fotodegradació dels bromofenols s'efectuen, principalment, sobre els congèneres monobromats. La majoria d'aquests treballs han emprat radiació UV i s'han realitzat en solucions aquoses oxigenades o no oxigenades.

S'ha observat en diversos treballs que el mecanisme principal de la fotodegradació dels monobromofenols és la substitució nucleòfila de l'àtom de brom per un grup hidroxil, amb la consegüent formació de dihidroxibenzens i dihidroxibifenils com a productes de fotodegradació [Lipcynskakochany, 1992; Joschek, 1966; Durand, 1998]. D'altra banda, Bonnichon i col·laboradors. [Bonnichon, 2001] van estudiar la fotodegradació del 2BP i van suggerir la formació del fenol i de bifenil i àcid ciclopentadiènic. Més recentment, en l'any 2002, Akai i col·laboradors [Akai, 2002] van observar que el 2BP sota l'acció de la radiació UV pateix una transferència del brom de la posició orto a la posició *para* i, a més, van detectar la formació del 4-bromo-2,5 ciclohexadienona com a fotoproducte majoritari.

Hi ha pocs estudis sobre la fotoquímica de congèneres més bromats. Eriksson i col·laboradors. [Eriksson, 2004b] van estudiar la cinètica de fotodegradació del 2BP, del 26DBP i del 246TBP. Els resultats d'aquest estudi mostren un augment en la velocitat de degradació amb l'augment del grau de bromació. Recentment, Liu i col·laboradors. [Liu, 2011] van revelar, per primera vegada, que la fotodegradació del 24DBP produeix quantitats significatives de 2-OH-2,3',4,5'-tetraBDE (2OH-BDE68).

La fotodegradació dels bromofenols mitjançant la llum UV sembla ser un procés complex. En general, els diferents autors proposen diferents mecanismes de

degradació i la formació de diferents fotoproductes. Tal com s'ha vist, les dades sobre la cinètica i el mecanisme de fotodegradació, així com sobre la identitat dels productes de fotodegradació, són molt escasses. Cal tenir en compte que si els bromofenols mostren alguns efectes tòxics, també ens han de preocupar els productes de degradació, que poden donar lloc a productes més nocius, ja sigui per als humans o per al medi ambient. Per tant, es important conèixer el comportament d'aquest tipus de compostos sota l'acció de la llum.

En la present memòria s'ha estudiat la fotodegradació de bromofenols de diferents graus de bromació i s'han aplicat per primera vegada mètodes quimiomètrics com a tècniques per a elucidar la cinètica de fotodegradació d'aquests compostos. D'aquesta manera, s'han establert les cinètiques de fotodegradació dels bromofenols i s'han detectat o identificat (mitjançant HPLC-MS) un gran nombre de fotoproductes, el que ha possibilitat plantejar hipòtesis dels mecanismes de fotodegradació per a alguns dels compostos amb menor nombre d'àtoms de brom, tal com es veurà en l'apartat de resultats.

Taula 2.8. Estudis de fotodegradació dels bromofenols.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Observacions
[Joschek, 1966]	2BP, 3BP, 4BP en aigua.	Fotòlisi instantània (<i>Flash photolisi</i>) amb Làmpada de mercuri de baixa pressió.	-----	TLC ^a	4BP dóna 4,4'-dihidroxibifenil i 1,4-dihidroxibenzè; 3BP dóna 3,3'-dihidroxibifenil i 1,3-dihidroxibenzè; i el 2BP dóna 2,2-dihidroxibifenil i 1,2-dihidroxibenzè.
Lipcynskakochany , 1992]	3BP i 4BP en solució aquosa oxigenada.	Fotòlisi instantània (<i>Flash photolisi</i>) amb làmpades de Xe.	Mitjançant disminució d'àrees de pic (càlcul del ϕ).	HPLC-UV	Fotoproductes: 1,4-benzoquinona (producte majoritari), 1,4-dihidroxibenzè i 2-hidroxi-1,4-benzoquinona per 4BP i 1,3-dihidroxibenzè per 3BP. Eficàcia de degradació 4BP > 3BP.
[Durand, 1998]	4BP en aigua i EtOH.	Fotòlisi en estat estacionari (<i>steady state photolysis</i>) Fotòlisi instantània (<i>Flash photolysis</i>) amb longitud d'excitació 266nm.	A partir de disminució de la fluorescència i l'absorbància (càlcul de la k i del ϕ).	HPLC-UV HLC-MS	Els fotoproductes: 1,4-benzoquinona 1,4-dihidroxibenzè.
[Bonnichon, 2001]	2BP en solució aquosa oxigenada, desoxigenada i amb addició de 2-propanol.	Llum UV (280 nm).	Càlcul del ϕ del 2BP i dels seus fotoproductes mitjançant les absorbàncies i els polsos d'energia del làser.	HPLC	Cinètiques de primer ordre. En solucions desoxigenades, formació de fenol i 3 productes més (bifenils i àcids ciclopentadiènics). En solucions oxigenades no s'observa formació de fenols ni de bifenils. L'addició de 2-propanol afavoreix la formació de fenol i redueix la formació de bifenils. Velocitat: solució desoxigenada > solució oxigenada > solució amb 2-propanol.

Referència	Compostos, dissolvent o matriu	Font de radiació	Estudi de la cinètica	Identificació	Observacions
[Akai,2002]	2BP, 24DBP en matriu d'argó a baixa temperatura.	Llum UV (140-240 nm)	Canvis en l'absorbància de les bandes d'IR	FTIR ^c i DFT ^d	Hi ha transferència del brom de la posició orto a la <i>para</i> . 4-bromo-2,5- ciclohexadienona és el producte majoritari de 2BP.
[Eriksson, 2004b]	2BP, 26DBP, 246TBP solució aquosa pH=10.	Fotoreactor equipat amb un tub fluorescent que emet a longituds d'ona similars a la llum solar	Mitjançant disminució d'àrees de pic en HPLC-UV. (càlcul de la k , $t_{1/2}$ i del ϕ)	-----	2-BP $k = 0,10 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 115 \text{ min}$), $\phi=0,29$ 2,6-DBP $k = 0,13 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 87 \text{ min}$), $\phi=0,096$ 2,4,6-TBP $k = 0,75 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 15 \text{ min}$), $\phi=0,046$.
[Liu, 2011]	24DBP en solució aquosa a diferents pHs.	Làmpada de Xe (simulació de la llum solar)	Mitjançant disminució d'àrees de pic	GC-MS	Identificació de 4-bromo-1,2-dihidroxibenzè, 2-bromo-1,4-dihidroxibenzè i 4,6-dibromo-1,2-dihidroxibenzè i quantitats significatives de 2'-OH-BDE68 (sobretot a concentracions altes de 24DBP i intensitat de la llum de radiació elevada i a pH baix).

^(a) TLC= Cromatografia en capa prima (thin layer chromatography)

^(b) $\phi_k = k_\lambda / 2,303E_\lambda \epsilon_\lambda$. k_λ es la constant cinètica de degradació a una determinada λ ; E_λ és l'energia emesa per la font de radiació; ϵ_λ és el coeficient d'absorció del compost a la λ considerada i ϕ_k és el rendiment quàntic a la λ considerada). Aquesta expressió dona idea sobre l'eficàcia de la fotodegradació directa [Kari, 1995].

^(c) FTIR = Espectroscòpia d'infraroig per transformada de fourier (de l'anglès *Fourier transform infrared spectroscopy*)

^(d) DFT = Teoria del funcional de la densitat (de l'anglès *density-functional-theory*)

2.2.2. ESTUDIS DE BIODEGRADACIÓ

Característiques generals

S'entén com a biodegradació d'un contaminant el resultat de totes les biotransformacions que pateix en un entorn concret a càrrec dels diferents organismes que hi operen (fonamentalment microorganismes). La capacitat biotransformadora dels organismes és molt diferent i està relacionada amb el seu grau d'exposició als contaminants.

S'anomena biotransformació o metabolització al conjunt de reaccions mitjançant les quals els organismes modifiquen l'estructura d'un contaminant. En general, els contaminants són compostos lipòfils i, per tant, tenen una tendència natural a acumular-se en els entorns lipídics dels organismes. D'aquesta manera, podem preveure que la biotransformació d'un contaminant consisteix, fonamentalment, en incrementar la hidrosolubilitat per tal de facilitar-ne l'eliminació. Aquest és el mecanisme més comú que utilitzen els organismes per transformar i eliminar els contaminants ambientals i es realitza principalment en el fetge (vegeu Figura 2.5).

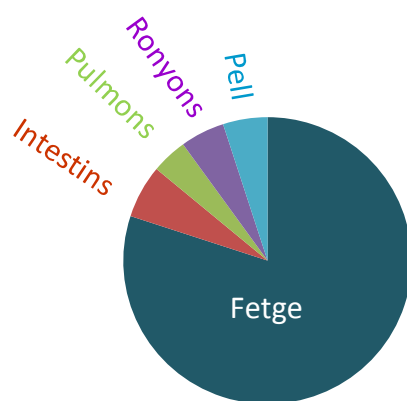


Figura 2.5. Representació esquemàtica de la importància relativa dels diferents òrgans en les reaccions de biotransformació.

El procés de biotransformació d'un contaminant dona com a resultat metabòlits més fàcils d'excretar i es realitza per etapes (vegeu Figura 2.6). En una primera etapa, coneguda com a fase I, succeeixen una sèrie de processos químics de diferent naturalesa (principalment oxidació, reducció, hidròlisi, peroxidació, deshalogenació, etc.) que modifiquen l'estructura química del contaminant amb l'aparició de nous grups funcionals. El metabòlit o metabòlits formats són més polars, més reactius i sensiblement menys lipòfils.

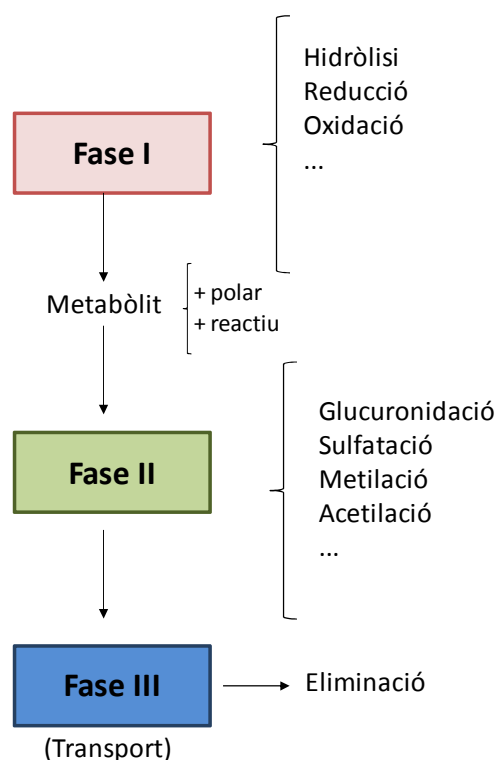


Figura 2.6. Etapes de biotransformació dels contaminants.

Els metabòlits generats en la fase I s'uneixen sovint de manera covalent a molècules endògenes de la cèl·lula, tals com l'àcid glucurònic, sulfats i aminoàcids, per generar compostos conjugats (reaccions de fase II). Aquest procés comporta un augment considerable de la hidrosolubilitat, que va generalment associat a una disminució de la seva activitat toxicològica.

Els processos de la fase I i de la fase II faciliten l'eliminació renal o biliar dels metabòlits (fase III), però no tots els contaminants pateixen un procés de fase I seguit d'un de fase II. L'objectiu principal de les reaccions de biotransformació és el de modificar la hidrofobicitat d'un compost per tal de facilitar la seva eliminació i, en ocasions, aquest objectiu s'aconsegueix tan sols amb reaccions de fase I, o amb reaccions de fase II o amb combinació d'ambdues (vegeu Figura 2.7). En els processos de biotransformació on només intervenen les reaccions de fase I, els metabòlits que es formen poden ser més tòxics que els compostos parentals. D'això ve la importància del coneixement del procés de biotransformació dels contaminants.

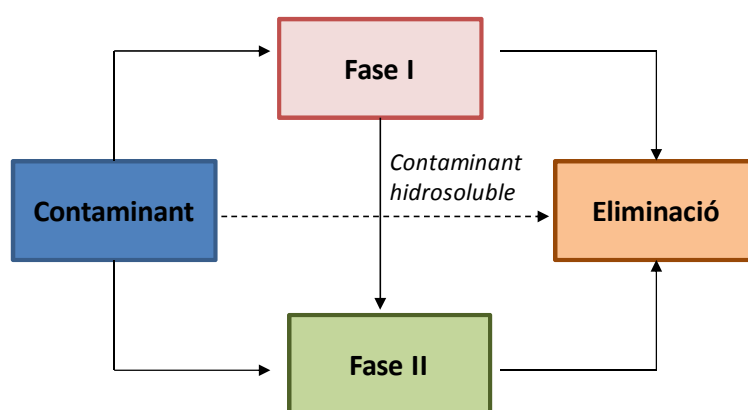


Figura 2.7. Processos de biotransformació que poden patir els contaminants.

Les reaccions de fase I són catalitzades per un grup d'enzims que es troben tant en el citosol com en el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules. En la fracció citosòlica hi ha enzims tals com les reductases, hidrolases i peroxidases que catalitzen les reaccions de reducció, d'hidròlisi i peroxidació, respectivament. No obstant això, la contribució d'aquests enzims en el metabolisme dels contaminants i dels xenobiòtics (cossos estranys per a l'organisme) és, en general, petita. Les reaccions de fase I més

importants són les d'oxidació i, generalment, són catalitzades per enzims presents en la fracció microsomal (reticle endoplasmàtic) de les cèl·lules hepàtiques. Aquests enzims s'anomenen monooxigenases i utilitzen un dels àtoms de l'oxigen molecular (O_2) per a oxigenar el contaminant (oxidació i la incorporació d'oxigen al contaminant) mentre l'altre àtom d'oxigen queda reduït a H_2O . Existeixen dues grans famílies d'oxigenases en el fetge: les flavin-monooxigenases (anomenades FMO) i les monooxigenases que depenen del citocrom P450 (anomenades P450 i CYP). Aquestes últimes són les principals responsables del metabolisme dels xenobiòtics (vegeu Figura 2.8) [Goeptar, 1995].

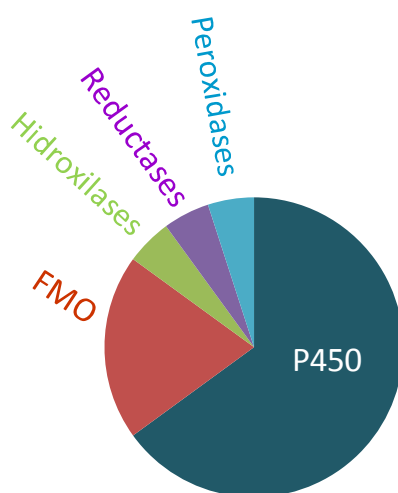


Figura 2.8. Contribució dels diferents enzims en el metabolisme dels xenobiòtics (fase I).

Les monooxigenases dependents del citocrom P450 (denominades de manera abreviada P450) són un conjunt d'hemoproteïnes de massa molecular al voltant dels 50 KDa. S'ha d'esmentar que l'origen del nom citocrom P450, ve de que és una proteïna cromogen que quan s'uneix al monòxid de carboni dona una forma reduïda que presenta un màxim d'absorció a 450 nm [Nelson, 1996]. El citocrom P450 constitueix una família relativament extensa de gens (CYP) agrupats en diferents famílies i subfamílies en funció del grau d'homologia en la seqüència del DNA que

les codifica. Com s'observa en la Figura 2.9-a les famílies s'anomenen amb un número, les subfamílies amb una lletra i les isoformes que trobem dins de les subfamílies es denominen també amb un número. Hi ha moltes formes de citocrom P450 o isoenzims que donen característiques particulars a l'organisme que les conté. D'aquesta manera es presenta una diferenciació en el procés de biotransformació intra i interespecie [Nelson, 1996]. Per exemple, en l'ésser humà existeixen 16 famílies i 29 subfamílies, amb un total d'uns 50 gens CYP identificats (vegeu Figura 2.9-b) [Lewis, 2004].

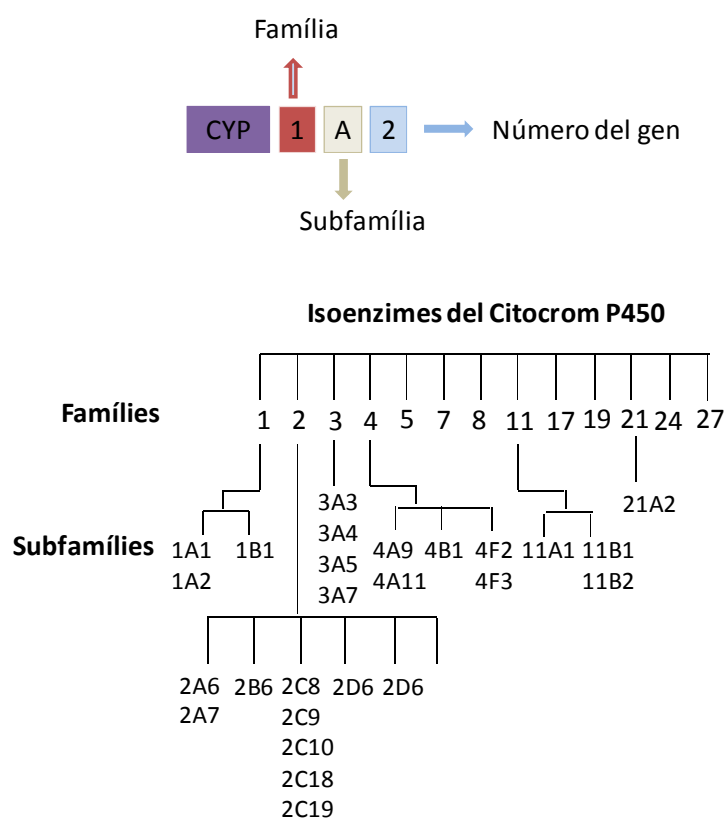


Figura 2.9. (a) Com s'anomenen els isoenzims del Citocrom P450. (b) Els diferents isoenzims del Citocrom P450 identificats en l'ésser humà.

L'acció del sistema citocrom P450 requereix de la coparticipació d'un enzim auxiliar (CYPreductasa) a través del qual flueixen els electrons necessaris per a la

reducció d'un dels àtoms de la molècula d'oxigen per a formar H_2O i de l'ús de l'altre àtom d'oxigen per a la consegüent oxidació del contaminant a la seva forma hidroxilada (vegeu Figura 2.10) [Winters, 1993].

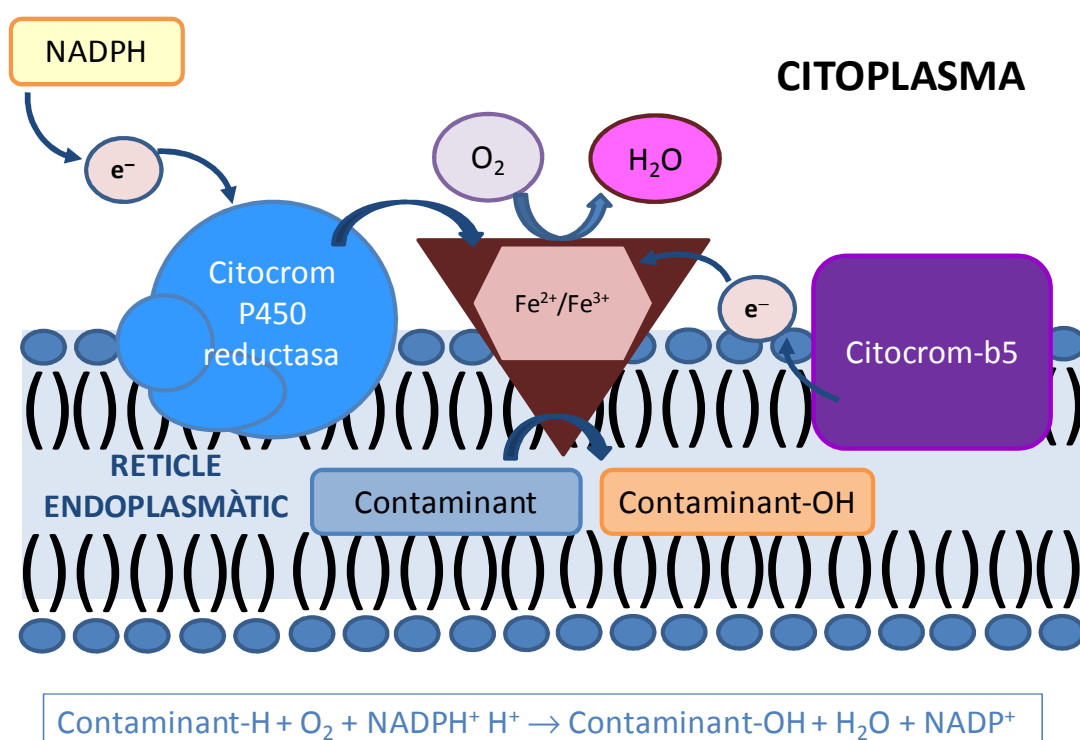


Figura 2.10. Components del sistema citocrom P450.

El cicle catalític del citocrom P450 es mostra en detall a la Figura 2.11. [Ingelman, 2002]. El grup hemo del citocrom es troba en estat Fe^{+3} i en aquestes condicions s'uneix al contaminant (1). El citocrom és reduït ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$) gràcies al citocrom P450 reductasa que rep els seus electrons a partir de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduïda (NADPH) (2). És en aquest moment quan l'oxigen molecular entra en el centre catalític de l'enzim, s'associa al grup hemo i forma un complex superòxid ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$) (3). Un segon electró canalitzat a través del citocrom b5 permet reduir parcialment la molècula d'oxigen unida i la formació d'una

espècie activada d'oxigen ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-$) (4). La molècula d'oxigen parcialment reduïda s'uneix a dos protons i allibera un dels seus àtoms en forma d' H_2O (5). L'altre àtom d'oxigen oxida el contaminant que es troba en el centre catalític de l'enzim (6). Finalment, el contaminant hidroxilat (metabòlit) s'allibera de l'enzim (7) i el cicle pot tornar a començar.

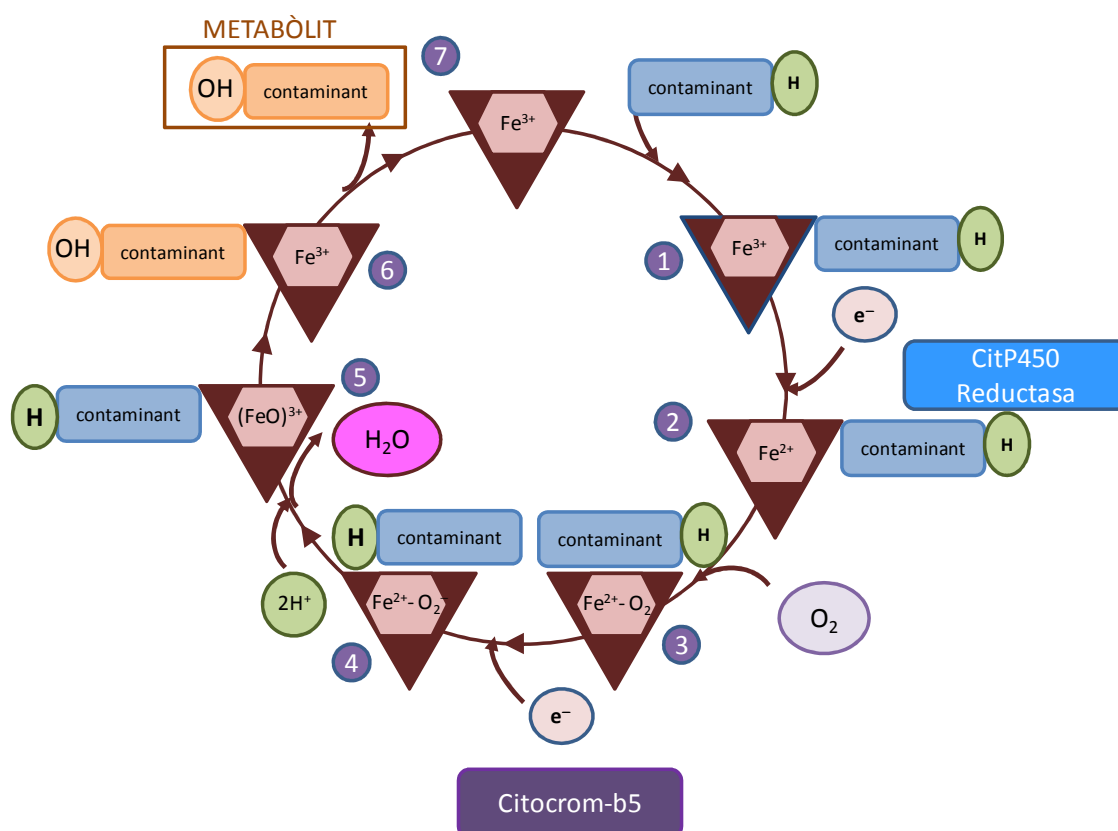


Figura 2.11. Mecanisme de catàlisi del citocrom P450.

En resum, el sistema citocrom P450 és el principal responsable del metabolisme dels xenobiòtics i no es tracta d'un únic enzim, sinó d'una família de hemoproteïnes. Les famílies 1, 2, 3 (CYP1, CYP2 i CYP3) i en menor mesura la 4 (CYP4) estan constituïdes per enzims encarregats de la biotransformació de

xenobiòtics, mentre que la resta de famílies inclouen CYPs que intervenen en la biosíntesi i en el metabolisme dels compostos endògens. D'aquesta manera, quan es parla del metabolisme d'un contaminant que es realitza a través del citocrom P450, l'enzim s'anomena, generalment, amb el número de família, la lletra de la subfamília i el número de la isoforma.

Atesa la ubiqüitat dels retardants de flama en el medi ambient, no és d'estranyar que aquests compostos siguin assimilats pels éssers vius. Aquests compostos poden experimentar fenòmens de bioacumulació i biomagnificació a través de les cadenes tròfiques. En aquest sentit, els compostos menys bromats es troben en major proporció en mostres biològiques, la qual cosa pot indicar que els compostos de major grau de bromació han estat susceptibles de degradació metabòlica [Birnbbaum, 2004]. En aquesta tesi s'han utilitzat microsomes de fetge de rata en el quals s'indueixen els enzims CYP1A, CYP2B i CYP3A4 per tal d'estudiar la biotransformació de la mescla DecaBDE.

2.2.2.1. ESTUDIS DE BIOTRANSFORMACIÓ DELS DIFENILÈTERS POLIBROMATS. ANTECEDENTS

La biotransformació dels PBDE en el medi ambient pot conduir a la producció de compostos més actius i persistents en el medi ambient. Hi ha diversos estudis realitzats sobre la metabolització *in vivo* i *in vitro* dels PBDE, sobretot dels pentaBDE i, en particular, del BDE99 (2,2',4,4',5-pentaBDE). La majoria dels autors proposen mecanismes de biotransformació basats en la desbromació oxidant (formació de PBDE hidroxilats, OH-BDE) i en la desbromació reductora (formació de PBDE amb menor nombre de broms). Els treballs s'han realitzat utilitzant diversos organismes, rates, ratolins, peixos i ocells i s'ha observat que la metabolització dels PBDE depèn de l'estructura i la substitució dels broms en cadascun dels anells.

La majoria dels estudis realitzats sobre la biotransformació del BDE99 en animals suggereix que la hidroxilació aromàtica i la desbromació oxidant catalitzades pel citocrom P450 són els principals mecanismes de biotransformació d'aquest congènere. [Chen, 2006; Hakk, 2002; Staskal, 2006]. Per tant, l'administració de BDE99 en animals, com ara rates i ratolins, dona lloc a la formació de pentaBDE i tetraBDE hidroxilats. No obstant això, altres treballs sobre la metabolització d'aquest congènere en peixos van mostrar la formació de tetraBDE com a metabòlits majoritaris, la qual cosa indica que el BDE99 pateix desbromació reductora [Benedict, 2007; Browne 2009].

Malgrat la identificació de diferents metabòlits del BDE99, diferents autors revelen que la capacitat de metabolització d'aquest compost és molt baixa [Hakk, 2002, Staskal, 2006; McKinney, 2006]. Per exemple, Hakk i col·laboradors [Hakk, 2002] van trobar que els excrements de rates exposades a BDE99 contenien principalment el compost original (més del 90 %) i només el 10 % eren metabòlits.

Pel que fa al grau de metabolització dels PBDE, sembla que depèn del grau de bromació i de la posició dels àtoms de broms en cadascun dels anells [McKinney, 2006; Staskal, 2006]. McKinney i col·laboradors [McKinney, 2006] van estudiar el metabolisme de diversos PBDE amb diferent grau de bromació (de tri- a heptaBDE) mitjançant microsomes de rates i balenes. Els resultats d'aquest estudi van revelar que els congèneres que tenien broms en posició *orto* i *meta* eren els que presentaven una major metabolització.

En relació al metabolisme del congènere BDE209, objectiu d'estudi d'aquesta tesi, hi ha diversos estudis realitzats en rates [Howe, 2007; Mörck, 2003], peixos [Birnbaum, 2004; Stapleton, 2004, 2006] i ocells [Van den Steven, 2007]. En els diferents estudis realitzats en rates es va observar que aquest congènere produeix metabòlits de menor nombre de broms i PBDE metoxilats i hidroxilats, encara que

els mecanismes d'aquesta degradació no són del tot clars. A més, en els diferents estudis s'observa que el grau de metabolització del BDE209 és bastant elevat (65 % dels excrements contenen metabòlits) en comparació amb els congèneres amb un grau de bromació inferior.

En general, tots els autors han descrit que la desbromació reductora, desbromació oxidant i la hidroxilació aromàtica són els principals mecanismes de biotransformació dels PBDE. A més, sembla que existeix l'evidència que els PBDE més bromats són metabolitzats a congèneres amb menor nombre de broms, els quals es metabolitzen en menor proporció i, per tant, són més tòxics. És important saber la biotransformació d'aquest tipus de compostos i la identitat dels seus metabòlits, ja que aquests poden ser potencialment més tòxics que els compostos originals.

En aquesta tesi, s'ha estudiat la metabolització *in vitro* de la mescla DecaBDE amb microsomes de fetge de rata als quals se'ls ha induït els enzims CYP1A, CYP2B i CYP3A4 i s'ha pogut detectar una disminució de la quantitat d'aquest congènere, la qual cosa significa que es produeix biotransformació.

2.3. BIBLIOGRAFIA

[Acero, 2005]

J.L. Acero, P. Piriou, U. von Gunten. *Kinetics and mechanisms of formation of bromophenols during drinking water chlorination: Assessment of taste and odor development*. Water Res. 39 (2005) 2979.

[Ahn, 2006]

M-Y. Ahn, T. Filley, C. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz. *Photodegradation of Decabromodiphenyl Ether adsorbed onto clay minerals, metal oxides, and sediment*. Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 215.

[Alaee, 2002]

M. Alaee, N. Bunce, M. Ikonomou, M. Lebeuf, C. Metcalf, D. Muir, J. Ryan, D. Sergeant, K. Solomon, B. Wakeford, M. Whittle. *Impact of polybrominated diphenylethers to Canadian environment and health of Canadians*. TSRI report 237, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada (2002).

[Alaee, 2003]

M. Alaee, P. Arias, A. Sjodin, A. Bergman. *An overview of commercially used brominated flame, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release*. Environ. Int. 29 (2003) 683.

[Akai, 2002]

N. Akai, S. Kudoh, M. Takayanagi, M. Nakata. *Photoreaction mechanisms of 2-bromophenols studied by low-temperature matrix-isolation infrared spectroscopy and density-functional-theory calculation*. Chem. Phys. Lett. 363 (2002) 591.

[Allchin, 1999]

C.R. Allchin, R.J. Law, S. Morris. *Polybrominated Diphenylethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK*. Environ. Pollut. 105 (1999) 197.

[Andersson, 1981]

Ö. Andersson, G. Blomkvist. *Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden*. Chemosphere 10 (1981) 1051.

[ATSDR, 2004]

ATSDR. *Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers*. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. U.S. Public Health Service. Atlanta, GA (2004).

[Barcellós de Rosa, 2003]

M. Barcellós de Rosa, H-U. Krüger, S. Thomas, C. Zetzsch. *Photolytic debromination and degradation of decabromodiphenyl ether, an exploratory kinetic study in toluene*. Fresen. Environ. Bull. 12 (2003) 940.

[Ballschmiter, 1993]

K. Ballschmiter, A. Mennel, J. Buyten. *Long chain alkyl-polysiloxanes as non-polar stationary phases in capillary gas chromatography*. Fresen. J. Anal. Chem. 346 (1993) 396.

[Benedict, 2007]

R. T. Benedict, H. M. Stapleton, R. J. Letcher, C. L. Mitchelmore. *Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (Cyprinus carpio) microflora and microsomes*. Chemosphere 69 (2007) 987.

[Bezares-Cruz, 2004]

J. Bezares-Cruz, C. Jafvert, I. Hua. *Solar Photodecomposition of Decabromodiphenyl Ether: Products and Quantum Yield*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4149.

[Birnbaum, 2004]

L.B. Birnbaum, D. Staskal. *Brominated flame retardants: Cause for concern?* Environ. Health Persp. 112 (2004) 9.

[de Boer, 2003]

J. de Boer, P.G. Wester, A. van der Horst, P.E.G. Leonards. *Polybrominated Diphenyl Ethers in Influent, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands*. Environ. Pollut. 122 (2003) 63.

[Bonnichon, 2001]

F. Bonnichon, C. Richard, G. Grabner. *Formation of an α -ketocarbene by photolysis of aqueous 2-bromophenol*. Chem. Commun. 1 (2001) 73.

[Browne, 2009]

E.P. Browne, H.M. Stapleton, S.M. Kelly, S.C. Tilton, E.P. Gallagher. *In vitro hepatic metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE 99) in Chinook salmon (Onchorhynchus tshawytscha)*. Aquat Toxicol. 92 (2009) 281.

[BSEF, 2001]

BSEF. Brussels: Bromine Science and Environmental Forum. Major Brominated Flame Retardants Volume Estimates: Total Market Demand by Region. Available: http://www.bsef-site.com/docs/BFR_vols_2001.doc [accessed 15 February 2003].

[Bureau, 2010]

E.E. Bureau. DECA Press Release Retrieved July/20/2010. 2010. From <http://www.eeb.org/documents/010408-DECA-PRESS-RELEASE-FINAL.pdf>.

[Burrows, 2002]

H.D. Burrows, M. Canle, J.A. Santaballa, S. Steenken. *Reaction pathways and mechanisms of photodegradation pesticides*. J. Photochem. Photobiol. B 67 (2002) 71.

[Cetin, 2005]

B. Cetin, M. Odabasi. *Measurement of Henry's law constants of seven polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners as a function of temperature*. Atmos. Environ 39 (2005) 5273.

[Chen, 2006]

L.J. Chen, E.H. Lebetkin, J.M. Sanders, L.T. Burka. *Metabolism and disposition of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE99) following a single or repeated administration to rats or mice*. Xenobiotica 36 (2006) 515.

[Christiansson, 2009]

A. Christiansson, J. Eriksson, D. Teclechiel, Å. Bergman. *Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether*. Environ. Sci. Pollut. Res. 16 (2009) 312.

[Covaci, 2003]

A. Covaci, S. Voorspoels, J. Boer. *Determination of Brominated Flame Retardants, with emphasis on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) in environmental and human samples-A review*. Environ. Int. 29 (2003) 735.

[Dabrowska, 2004]

D. Dabrowska, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik. *The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation*. Polish J. Environ. Stud. 13 (2004) 617.

[Dabrowska, 2005]

D. Dabrowska, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik. *Pathways and analytical tools in degradation studies of organic pollutants*. Crit. Rev. Anal. Chem. 35 (2005) 155.

[Darnerud, 2001]

P.O. Darnerud, G.S. Eriksen, T. Johannesson, P.B. Larsen, M. Viluksela. *Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology*. Environ. Health Persp. 109 (2001) 49.

[Darnerud, 2003]

P.O. Darnerud. *Toxic effects of brominated flame retardants in man and wildlife*. Environ. Health Persp. 29 (2003) 841.

[Davis, 2009]

E. Davis, H. Stapleton. *Photodegradation pathways of nonabrominated diphenyl ethers, 2-ethylhexyltetra bromobenzoate and di(2-ethylhexyl)tetra bromophthalate: identifying potential markers of photodegradation*. Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 5739.

[Directiva 2002/95/CE]

Directiva 2002/95/CE del Parlament Europeu i del Consell del 27 de gener del 2003 sobre restriccions a la utilització de determinades substàncies perilloses en aparells elèctrics i electrònics. *Diario Oficial de la Unión Europea* L37 (2003).

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:037:0019:0023:es:PDF>.

[Directiva 2003/11/CE]

Directiva 2003/11/CE del Parlament Europeu i del Consell de 6 de febrer de 2003 per la que es modifica per vigesimocuartavegades la Directiva 76/769/CEE del Consell relativa a la aproximació de les disposicions legals, reglamentàries i administratives de els Estats membres que limiten la comercialització i el ús de determinades substàncies i preparats perillosos (éter de pentabromodifenil, éter de octabromodifenil) *Diario Oficial de la Unión Europea* L42 (2003).

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:042:0045:0046:es:PDF>

[Durand, 1998]

A-P. Durand, R.G. Brown, D. Worrall, F. Wilkinson. *Study of the aqueous photochemistry of 4-fluorophenol, 4-bromophenol and 4-iodophenol by steady state and nanosecond laser flash photolysis*. J Chem. Soc. Perk. T 2 (1998) 365.

[Ellinger, 2003]

S. Ellinger, R. Hackenberg, K. Ballschmitter. *Determination of logK_{ow} values for polybrominated diphenyl ether (PBDE) by capillary gas Chromatography and by total surface area (TSA) correlation*. Organohalogen Compounds 63 (2003) 341.

[EPA IRIS, 2008]

EPA Integrated Risk Information System (IRIS) "Decabromodiphenyl ether (BDE-209) (CASRN 1163-19-5)." <http://www.epa.gov/IRIS/subst/0035.htm>.

[EPA OPPT, 2008]

EPA Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT). 2008. Polybrominated Diphenylethers.

www.epa.gov/oppt/pbde/

[Eriksson, 2004a]

J. Eriksson, N. Green, G. Marsh, A. Bergman. *Photochemical Decomposition of 15 Polybrominated Diphenyl Ether congeners in methanol/water*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 3119.

[Eriksson, 2004b]

J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson. *Photochemical transformations of tetrabromobisphenol A and related phenols in water*. Chemosphere 54 (2004) 117.

[Fang, 2008]

L. Fang, J. Huang, G. Yu, L. Wang. *Photochemical degradation of six polybrominated diphenyl ether congeners under ultraviolet irradiation in hexane*. Chemosphere 71 (2008) 258.

[Flodin, 1999]

C. Flodin, F.B. Whitfield. *Biosynthesis of bromophenols in marine algae*. Water Sci. Technol. 40 (1999) 53.

[Flodin, 2000]

C. Flodin, F.B. Whitfield. *Brominated anisoles and cresols in the red alga *Polysiphonia sphareocarpa**. Phytochemistry 53 (2000) 77.

[la Guardia, 2006]

M.J. la Guardia, R. Hale, E. Harvey. *Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Congener Composition of the Widely Used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE Technical Flame Retardant Mixtures*. Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 6247.

[Guill, 2004]

U. Guill, I. Chu, J.J. Ryan, M. Feeley. *Polybrominated diphenyl ethers: human tissue levels and toxicology*. Rev. Environ. Contam. T. 183 (2004) 55.

[Hagberg, 2006]

J. Hagberg, H. Olsman, B. van Bavel, M. Engwall, G. Lindström. *Chemical and toxicological characterization of PBDF from photolytic decomposition of decaBDE in toluene*. Environ. Int. 32 (2006) 851.

[Hakk, 2002]

H. Hakk, G. Larsen, E. Klasson-Wehler. *Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat*. Xenobiotica 32 (2002) 369.

[Han, 2005]

J. Han, H. Lee, F.-M. Tao. *Molecular Structures and Properties of the Complete Series of Bromophenols: Density Functional Theory Calculations*. J. Phys. Chem. A. 109 (2005) 5186.

[Hassenklöver, 2006]

T. Hassenklöver, S. Predehl, J. Pili, J. Ledwolorz, U. Bickmeyer. *Bromophenols both present in marine organisms and industrial flame retardants, disturb cellular Ca^{2+} signaling in neuroendocrine cells (PC12)*. Aquat. Toxicol. 76 (2006) 37.

[Hale, 2001]

R.C. Hale, M.J. la Guardia, E.P. Harvey, T.M. Mainor, W.H. Duff, M.O. Gaylor. *Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Virginia freshwater fishes (USA)*. Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 4585.

[Hale, 2003]

R. Hale, M. Alaei, J. Manchester-Nessving, H.M. Stapleton, M.G. Ikonou, M.P. Arias. *Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment*. Environ. Int. 29 (2003) 771.

[Hale, 2006]

R. Hale, M.J. La Guardia, E. Harvey, M.O. Gaylor, T.M. Mainor. *Brominated Flame Retardant Concentrations and Trends in Abiotic Media*. Chemosphere, 64(2006) 181.

[Herzke, 2005]

D. Herzke, U. Berger, R. Kallenborn, T. Nygard, W. Vetter. *Brominated Flame Retardants and Other Organobromines in Norwegian Predatory Bird Eggs*. Chemosphere 61 (2005) 441.

[Higa, 1980]

T. Higa, T. Fujiyama, P.J. Scheuer. *Halogenated phenol and indole constituents of arcon worms*. Comp. Biochem. Phys. B 65 (1980) 525.

[Hites, 2004a]

R.A. Hites. *Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in People: A Meta-Analysis of Concentrations*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 945.

[Hites, 2004b]

R.A. Hites, J.A. Foran, S.J. Schwager, B.A. Knuth, M.C. Hamilton, D.O. Carpenter. *Global Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers in Farmed and Wild Salmon*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4945.

[Holms, 1993]

G. Holms, L. Norrgren, T. Andersson, A. Thuren. *Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN, or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus*. Aquat. Toxicol. 27 (1993) 33.

[Holt, 2000]

M.S. Holt. *Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment*. Food Chem. Toxicol. 38 (2000) S1.

[Howe, 2005]

P.D. Howe, S. Dobson, H.M. Malcolm. *2,4,6-Tribromophenol and other simple brominated phenols*. Concise International Chemical Assessment Document 66, World Health Organization, 2005.

[Huwe, 2007]

J.K. Huwe, D.J. Smith. *Accumulation, Whole-Body Depletion, and Debromination of Decabromodiphenyl Ether in Male Sprague–Dawley Rats Following Dietary Exposure*. Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 2371.

[Hua, 2003]

I. Hua, N. Kang, C.T. Jafvert, J. Fàbrega-Duque. *Heterogeneous photochemical reactions of decabromodiphenyl ether*. Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 798.

[Hutzinger, 1980]

O. Hutzinger (Ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry, vol2, part A: Reaction and Processes*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1980) 7.

[Goeptar, 1995]

A.R. Goeptar, H. Sheerens, N.P.E Vermeulen. *Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450*. Crit. Rev. Toxicol. 25 (1995) 25.

[Ikonomou, 2002a]

M.G. Ikonomou, S. Rayne, R.F. Addison. *Exponential Increases of the Brominated Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000*. Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1886.

[Ikonomou, 2002b]

M.G. Ikonomou, S. Rayne, M. Fischer, M.P. Fernandez, W. Cretney. *Occurrence and Congener Profiles of Polybrominated Diphenyl Ethers in Environmental Samples from Coastal British Columbia, Canada*. Chemosphere 46 (2002) 649.

[Ingelman, 2002]

M. Ingelman-Sundberg. *Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity*. Toxicology. 181 (2002) 447.

[IUCLID, 2003]

Data set for 2,4,6-tribromophenol. Ispra, European Chemicals Bureau, International Uniform Chemical Information Database (IUCLID) (2003).

[IUPAC, 1996]

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Pure Applied Chemistry* 68 (1996) 2223-2286.

[Joschek, 1966]

H-I. Joschek, *Photocleavage of phenoxyphenols and bromophenols*. J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 3269.

[Kajiwara, 2004]

N. Kajiwara, D. Ueno, A. Takahashi, N. Baba, S. Tanabe. *Polybrominated Diphenyl Ethers and Organochlorines in Archived Northern Fur Seal Samples from the Pacific Coast of Japan, 1972-1998*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 3804.

[Kajiwara, 2008]

N. Kajiwara, Y. Noma, H. Takigami. *Photolysis Studies of Technical Decabromodiphenyl Ether (DecaBDE) and Ethane (DeBDethane) in Plastics under Natural Sunlight*. Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4404.

[Kari, 1995]

F.G. Kari, S. Hilger, S. Canonica. *Determination of the reaction Quantum Yield for the photochemical degradation of Fe(III): Implications for the environmental fate of EDTA in surface waters*. Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 1008.

[Kazda, 2004]

R. Kazda, J. Hajslová, J. Poustka, T. Cajka. *Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Milk Samples in the Czech Republic. Comparative Study of Negative Chemical Ionisation Mass Spectrometry and Time-of-Flight High-Resolution Mass Spectrometry*. Anal. Chim. Acta 520 (2004) 237.

[Kuivikko, 2007]

M. Kuivikko, T. Kotiaho, K. Hartonen. *Modeled Direct Photolytic Decomposition of Polybrominated Diphenyl Ethers in the Baltic Sea and the Atlantic Ocean*. Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 7016.

[Kuriyama, 2005]

S.N. Kuriyama, C.E. Talsness, K. Grote, I. Chahoud. *Developmental Exposure to Low Dose PBDE 99: 1-Effects on Male Fertility and Neurobehavior in Rat Offspring*. Environ. Health Persp. 113 (2005) 149.

[Lacorte, 2003]

S. Lacorte, M. Guillamon, E. Martinez, P. Viana, D. Barceló. *Occurrence and Specific Congener Profile of 40 Polybrominated Diphenyl Ethers in River and Coastal Sediments from Portugal*. Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 892.

[Lagalante, 2011]

A.F. Lagalante, C.S. Shedden, P.W. Greenbacker. *Levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in dust from personal automobiles in conjunction with studies on the photochemical degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209)*. Environ. Int. 37 (2011) 899.

[Lau, 1984]

S.S. Lau, T.J. Monks, K.E. Geene. *The role of ortho-bromophenol in the nephrotoxicity of bromobenzene in the rat*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 72 (1984) 539.

[Law, 2003]

R.J. Law, M. Alae, C.R. Allchin, J.P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom, G.A. Stern. *Levels and Trend of Polybrominated Diphenylethers and Other Brominated Flame Retardants in Wildlife*. Environ. Int. 29 (2003) 757.

[Lewis, 2004]

D.F. Lewis. *57 varieties: the human cytochromes P450*. Pharmacogenomics 3 (2004) 305.

[Li, 2008]

X. Li, J. Huang, L. Fang, G. Yu, H. Lin, L. Wang. *Photodegradation of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in nonionic surfactant solutions*. Chemosphere 73 (2008) 1594.

[Lipczynskakochany, 1992]

E. Lipczynskakochany. *Direct photolysis of 4-Bromophenol and 3-Bromophenol as studied by a flash photolysis/HPLC technique*. Chemosphere 24 (1992) 911.

[Liu, 2011]

H. Liu, H. Zhao, X. Quan, Y. Zhang, S. Chen, H. Zhao. *Formation of 2'-hydroxy-2,3',4,5'-tetrabromodiphenyl ether (2'-OH-BDE68) from 2,4-dibromophenol in aqueous solution under simulated sunlight irradiation*. Chemosphere 84 (2011) 512.

[Mazdai, 2003]

A. Mazdai, N.G. Dodder, M.P. Abernathy, R.A. Hites, R.M. Bigsby. *Polybrominated diphenyl ether in maternal and fetal blood samples*. Environ. Health Persp. 111 (2003) 1249.

[McKinney, 2006]

M. A. McKinney, S. de Guise, D. Martineau, P. Béland, A. Arukwe, R.J. Letcher. *Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (Delphinapterus leucas) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay.* Aquat. Toxicol. 77 (2006) 87.

[Meneses, 1999]

M. Meneses, H. Wingfors, M. Schuhmacher, J.L. Domingo, G. Lindstrom, B van Bavel. *Polybrominated Diphenyl Ethers Detected in Human Adipose Tissue from Spain.* Chemosphere 39 (1999) 2271.

[Mörck, 2003]

A. Mörck, H. Hakk, U. Orn, W. Klasson. *Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion.* Drug Metab. Dispos. 31(2003) 900.

[Müller, 1986]:

M.D. Müller, H.R. Buser. *Halogenated aromatic compounds in automotive emissions from leaded gasoline additives.* Environ. Sci. Technol. 20 (1986) 1151.

[Nelson, 1996]

D.R. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki, J.J. Stegeman, R. Feyereisen, D.J. Waxman. *P450 superfamily. Up date of new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.* Pharmacogenetics 6 (1996) 1.

[NICNAS, 2001]

Industrial Chemicals Notification and Assessments Scheme (NICNAS), Polybrominated Flame Retardants (PBFR). Priority Existing Chemical Assessment Report. No. 20. National Australian Government, Marrickville, New South Wales, 2001.

[Ohta, 2001]

S. Ohta, H. Nishimura, T. Nakao, O. Aozasa, H. Miyata. *Characterization of the photolysis of decabromodiphenyl ether and the levels of PBDE as its photoproducts in atmospheric air of japan.* Organohalogen Compounds. 52 (2001) 321.

[Ohta, 2002]

S. Ohta, D. Ishizuka, H. Nishimura, T. Nakao, O. Aozasa, Y. Shimidzu. *Comparison of the polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan.* Chemosphere 46 (2002) 689.

[Palm, 2002]

A. Palm, I.T. Cousins, D. Mackay, M. Tysklind, C. Metcalfe, M. Alaee. *Assessing the environmental fate of chemicals of emerging concern: a case study of the polybrominated diphenyl ethers.* Environ. Pollut. 117 (2002) 195.

[Palm, 2004]

W.U. Palm, R. Kopetzky, W. Sossinka, W. Ruck, C. Zetzsch. *Photochemical reactions of brominated diphenyl ethers in organic and adsorbed on silicon dioxide in aqueous suspension.* Organohalogen Compounds 66 (2004) 2269.

[Rayne, 2003]

S. Rayne, M.G. Ikonou, M. D. Whale. *Anaerobic microbial and photochemical degradation of 4,4'-dibromodiphenyl ether.* Water Res. 37 (2003) 551.

[Rayne, 2006]

S. Rayne, P. Wan, M. Ikonou. *Photochemistry of a major commercial polybrominated diphenyl ether flame retardant congener: 2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether (BDE153).* Environ. Int. 32 (2006) 575.

[Rayne, 2009]

S. Rayne, K. Forest, K.J. Friesen. *Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives*. A review. Environ. Int. 35 (2009) 425.

[Reglament (CE) n° 1907/2006]

Reglament (CE) n° 1907/2006 del Parlament Europeu i del Consell de 18 de desembre de 2006 relativo al registre, la evaluació, la autorització y la restricció de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como [la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0852:ES:PDF).

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0852:ES:PDF>.

[Sánchez-Prado, 2005a]

L. Sánchez-Prado, M. Llompart, M. Lores, C. García-Jares, R. Cela. *Investigation of photodegradation products generated after UV-irradiation of five polybrominated diphenyl ethers using photo solid-phase microextraction*. J. Chromatogr A 1071 (2005) 85.

[Sánchez-Prado, 2005b]

L. Sánchez-Prado, C. González-Barreiro, M. Lores, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela. *Photochemical studies of a polybrominated diphenyl ethers (PBDE) technical mixture by solid phase microextraction (SPME)*. Chemosphere 60 (2005) 922.

[Scheter, 2003]

A. Schecter, M. Pavuk, O. Papke, J.J. Ryan, L. Birnbaum, R. Rosen. *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) in U.S. Mothers' Milk*. Environ. Health Persp. 111 (2003) 1723.

[Scheter, 2004]

A. Schecter, O. Papke, K. Tung, D. Staskal, L. Birnbaum. *Polybrominated Diphenyl Ethers Contamination of United States Food*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004), 5306.

[Schure, 2004]

A. ter Schure, P. Larsson, C. Agrell, J.P. Boon. *Atmospheric Transport of Polybrominated Diphenyl Ethers and Polychlorinated Biphenyls to the Baltic Sea*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 1282.

[SCPOPs, 2010]

Stockholm convention on Persistent Organic Pollutants (SCPOPs). Programmes. New POPs. <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/The9newPOPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>

[Shih, 2009]

Y-H Shih, C-K Wang. *Photolytic degradation of polybromodiphenyl ethers under UV-lamp and solar irradiations*. J. Hazard. Mater. 165 (2009) 34.

[Sjödin, 2008]

A. Sjödin, O. Papke, E. McGahee, J-F. Focant, R.S. Jones, T. Pless-Mulloli, L-M. Leontjew Toms, T. Herrmann, J. Muller, L. Needham, D.G. Patterson Jr. *Concentration of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) in Household Dust from Various Countries*. Chemosphere 73 (2008) S131.

[Söderström, 2004]

G. Söderström, U. Sellström, C.A. de Wit, M. Tyskind. *Photolytic Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209)*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 127.

[Staskal, 2006]

D.F Staskal, H. Hakk, D Bauer, J.J. Diliberto, L.S. Birnbaum. *Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congener 47, 99, 100, and 153 in mice*. Toxicol. Sci. 94 (2006) 28.

[Stapleton, 2004]

H.M. Stapleton, M. Alae, R.J. Letcher, J.E. Baker. *Debromination of the flame retardants Decabromodiphenyl ether by juvenile carp (Cyprinus carpio) following dietary exposure*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 112.

[Stapleton, 2005]

H.M. Stapleton, N.G. Dodder, J.H. Offenberg, M.M. Schantz, S.A. Wise. *Polybrominated diphenyl in house dust and clothes dryer lint*. Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 925.

[Stapleton, 2006]

H.M. Stapleton, B. Brazil, R.D. Holbrook, C.L. Mitchelmore, R. Benedict, A. Konstantinov, D. Potter. *In Vivo and In Vitro Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209) by Juvenile Rainbow Trout and Common Carp*. Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 4653.

[Stapleton, 2008]

H.M. Stapleton, N.G. Dodder. *Photodegradation of decabromodiphenyl ether in house dust by natural sunlight*. Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 306.

[Sweetman, 1980]

J. Sweetman, M.S. Simmons. *The production of bromophenols resulting from chlorination of waters containing bromide ion and phenol*. Water Res. 14 (1980) 287.

[Szymanska, 1995]

J.A. Szymanska, E. Bruchajzer, J.K. Plotorski. *Investigations of acute hepato- and nephrotoxicity of pentabromophenol*. Int. J. Occup. Med. Environ. Health. 8 (1995) 245.

[Tanabe, 2004]

S. Tanabe. *PBDE, an Emerging Group of Persistent Pollutants*. Mar. Pollut. Bull. 49 (2004) 369.

[Tittlemier, 2002]

S.A. Tittlemier, T. Halldorson, G.A. Stern, G.T. Tomy. *Vapor Pressures, aqueous solubilities, and Henry's law constants of some brominated flame retardants*. Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 1804.

[TOXNET, 2009]

Toxicology Data Network. Hazardous Substances Databank, U. S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, last updated on 26-06-2009.

[Troitzsch, 1998]

J.H. Troitzsch. *An overview of flame retardants*. Chemistry Today 16 (1998)

[Van den Steen, 2007]

E. van den Steen, A. Covaci, V.L.B. Jaspers, T. Dauwe, S. Voorspoels, M. Eens, R. Pinxten. *Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (Sturnus vulgaris)*. Environ. Pollut. 148 (2007) 648.

[Vives, 2004]

I. Vives, J.O. Grimalt, S. Lacorte, M. Guillaumon, D. Barceló. *Polybromodiphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants in fish from lakes in European high mountains and Greenland*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 2338.

[Voordeckers, 2002]

J.W. Voordeckers, D.E. Fennell, K. Jones, M.M. Haggblom. *Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments*. Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 696.

[Watanabe, 1987]

I. Watanabe, R. Tatsukawa. *Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant decabromodiphenyl ether in hexane solution by UV and sun light*. B. Environ. Contam. Tox. Chem. 39 (1987) 953.

[Winters, 1993]

D.K. Winters, A.I. Cederbaum. Biochemistry of Cytochrome P450. In Hepatic and bile secretion: Physiology and pathophysiology 1993, edited by Tavaloni and PD Berk. Raven Press, Ltd., New York. Chapter 27, p. 407.

[de Wit, 2002]

C.A. de Wit. *An overview of brominated flame retardants in the environment*. Chemosphere 46 (2002) 583.

[WHO, 1994]

Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers. World Health Organization, Geneva 1994.

[WHO, 1997]

WHO. *Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A general introduction, International Program on Chemical Safety*, World Health Organization (1997).

[Xie, 2009]

Q. Xie, J. Chen, J. Shao, C. Chen, H. Zhao, C. Hao. *Important role of reaction field in photodegradation of deca-bromodiphenyl ether: Theoretical and experimental investigations of solvent effects*. Chemosphere 76 (2009) 1486.

[Zeep, 1983]

R.G. Zeep, P.F. Slotzhauer. *Influence of algae on photolysis rates of chemicals in water*. Environ. Sci. Technol. 17 (1983) 452.

[Zheng, 2004]

G.J. Zheng, M. Martin, B.J. Richardson, H. Yu, Y. Liu, C. Zhou, J. Li, G. Hu, M.H.W. Lam, P.K.S. Lam. *Concentrations of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) in Pearl River Delta Sediments*. Mar. Pollut. Bull. 49 (2004) 514.

CAPÍTOL3:

Part experimental

En aquest capítol es descriu de forma general la metodologia experimental emprada per a l'estudi dels processos de fotodegradació (secció 3.1) i processos de biotransformació (secció 3.2) presentats en aquesta memòria.

3.1. PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ

Els experiments de fotodegradació del producte comercial DecaBDE i dels bromofenols es basen en el seguiment de l'evolució d'aquests compostos sota una font de radiació mitjançant les tècniques instrumentals d'espectroscòpia d'absorció molecular i cromatografia. L'ús d'aquestes dues tècniques té per finalitat esbrinar els mecanismes i la identitat dels compostos formats durant els processos de fotodegradació. El resultats obtinguts han estat tractats amb mètodes quimiomètrics a causa de la complexitat de les mesures experimentals i dels mecanismes dels processos.

A continuació es presenten les fonts de radiació que es van utilitzar i es fa una descripció dels seguiments cinètics realitzats (espectroscòpic i cromatogràfic). Els mètodes quimiomètrics aplicats per a l'anàlisi d'aquestes mesures es descriuen en detall en el capítol 4.

3.1.1. FONTS DE RADIACIÓ

Les fotodegradacions han estat induïdes mitjançant dues fonts de radiació, que es descriuen a continuació:

- Una làmpada de vapor de Hg amb un màxim d'emissió a 253,4 nm i una potència de 15 W (Hereaus). Aquesta làmpada es va introduir en un tub d'immersió de quars amb un nivell de transmissió de llum UV del 92 %, que

es trobava acoblat a un fotoreactor.

- Un simulador de llum solar SUNTEST® CPS d'Atlas Material Testing Solutions, equipat amb una làmpada d'arc de Xenó de 1500 W (vegeu Figura 3.1). La intensitat seleccionada va ser de 600 W m^{-2} , que correspon a una dosi de llum de 2160 KJ.m^{-2} . També es va treballar a intensitats menors però simplement disminuïa la velocitat del procés. L'espectre de llum obtingut és molt similar al de la llum solar (vegeu Figura 3.2). L'equip disposa d'un ventilador que ajuda a equilibrar l'augment de temperatura que provoca la làmpada i la manté propera als 35°C . A més, conté un filtre de borosilicat que emet a un radiació constant per sobre de 280 nm , i les parets interiors són làmines metàl·liques brillants que enfoquen la radiació cap al recipient que conté la mostra. Les mostres s'exposen en l'interior d'un vial de quars de 20 mL de capacitat (vegeu Figura 3.1).



Figura 3.1. Simulador de llum solar SUNTEST. Dins hi ha els vials de quars amb les mostres exposades a la llum.

Per a tenir una visió global de les longituds d'ona a les que emeten les diferents fonts de radiació emprades, en la Figura 3.2 es mostra l'espectre d'emissió solar i s'indica la zona en la qual emeten la làmpada de vapor de Hg (llum UV) i el simulador de llum solar.

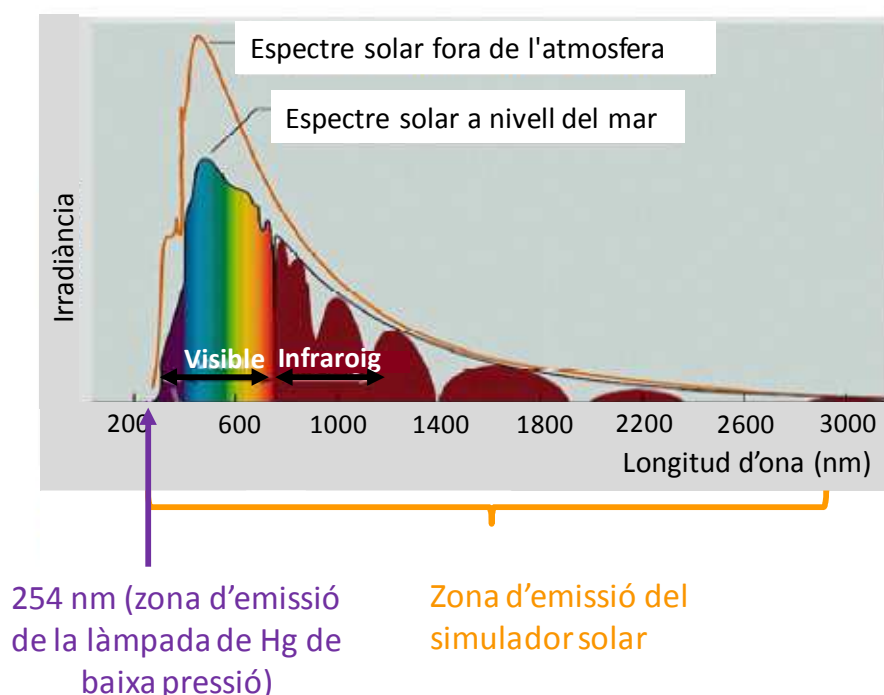


Figura 3.2. Espectre d'emissió solar. Zones d'emissió de la làmpada de Hg i del simulador de llum solar. Ampliació de la zona del visible

3.1.2. SEGUIMENT CINÈTIC DE LA FOTODEGRADACIÓ MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA D'ABSORCIÓ MOLECULAR

L'objectiu d'aquest experiment és seguir cinèticament la fotodegradació mitjançant l'adquisició d'una sèrie d'espectres UV a diferents temps de procés. En la Figura 3.3 es mostra l'esquema del muntatge utilitzat. La solució de treball s'introdueix en el fotoreactor (1) que conté la làmpada d'UV (2).

Aquesta làmpada emet llum a una longitud d'ona de 253,4 nm, que provoca la fotodegradació del compost parental i la formació de subproductes de fotodegradació. La solució del compost en el reactor es troba en agitació constant mitjançant un nucli magnètic. Mitjançant una bomba peristàtica (3), la solució del compost circula en un circuit tancat i continu entre el fotoreactor i la cel·la de mesura (4) de l'espectrofotòmetre (5). L'espectrofotòmetre adquireix espectres cada n segons mentre té lloc la degradació.

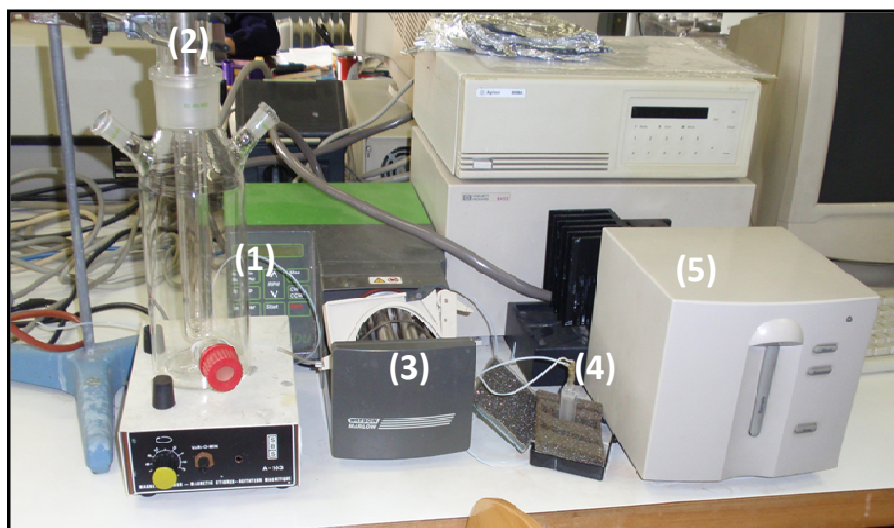


Figura 3.3. Dispositiu experimental associat al seguiment experimental per absorció molecular

Els retardants de flama estudiats en aquesta tesi presenten un espectre d'absorció en l'interval de longituds d'ona 200-400 nm; per tant, són susceptibles de fotodegradació sota les dues fonts de radiació descrites. A mode d'exemple, la Figura 3.4-a mostra l'espectre UV del DecaBDE en THF. Per efecte de la llum UV s'observen canvis espectrals en la solució, la qual

cosa indica que el DecaBDE s'està degradant i dóna lloc a la formació d'altres productes (vegeu Figura 3.4-b).

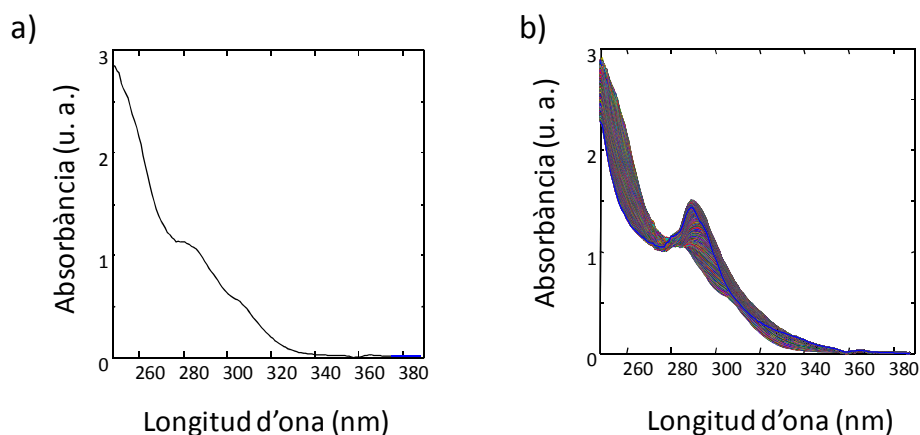


Figura 3.4. (a) Espectre UV del DecaBDE en THF. (b) Sèrie d'espectres corresponents al seguiment d'un procés de fotodegradació del DecaBDE en THF sota l'acció de la llum UV.

L'espectroscòpia d'absorció molecular en la zona de l'UV-Vis és una eina molt bona per a l'estudi de cinètiques de degradació. Tot i que no proporciona informació estructural suficient per a la identificació dels productes de degradació, és molt útil per a obtenir informació sobre el mecanisme i la cinètica del procés, ja que es poden adquirir molts espectres de forma ràpida i es pot tenir una descripció molt acurada de l'evolució del senyal (composició de la mostra) en funció del temps.

Per tal d'extreure aquesta informació, en aquesta tesi s'han utilitzat mètodes quimiomètrics tal com s'ha comentat anteriorment. Aquestes dades s'han d'exportar a l'entorn MATLAB per a poder ser tractades amb mètodes quimiomètrics. Amb aquesta finalitat, s'utilitza la macro Export (un petit

programa amb comandes pròpies del programari UV-Vis ChemStation), que crea arxius en format ASCII. A continuació aquests arxius es converteixen en arxius llegibles en MATLAB mitjançant una rutina creada en el nostre grup d'investigació.

3.1.3. SEGUIMENT CINÈTIC MITJANÇANT CROMATOGRAFIA

El seguiment cinètic per cromatografia es basa en la injecció d'una sèrie d'alíquotes de la solució sotmesa a fotodegradació recollides a diferents temps de procés. Aquest tipus d'experiment s'ha realitzat per a confirmar o ampliar la informació obtinguda amb el seguiment cinètic mitjançant espectroscòpia d'absorció molecular i amb la intenció de caracteritzar i identificar els possibles productes formats durant el procés.

Els temps de procés elegits en què s'han recollit les alíquotes s'han decidit en funció dels resultats obtinguts amb els experiments de seguiment cinètic per absorció molecular. Segons aquest resultat, es poden diferenciar fases en el procés de degradació amb velocitats diferenciades, que han suggerit els temps als quals és més informatiu prendre les alíquotes que seran injectades en el cromatògraf posteriorment.

La cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS) és la tècnica instrumental escollida per analitzar el DecaBDE i els seus productes de degradació, mentre que la cromatografia de líquids acoblada a un detector de díodes en sèrie i un espectròmetre de masses (HPLC-DAD-MS) es va triar per a l'anàlisi dels bromofenols i dels seus productes de degradació. L'ús d'una tècnica o una altra es deu a les diferents propietats fisicoquímiques que presenten els compostos en estudi.

A continuació, es fa una breu descripció de la determinació dels retardants de flama d'estudi (PBDEs i bromofenols) i dels seus productes de degradació mitjançant aquestes tècniques

Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS). Determinació del DecaBDE i dels seus productes de degradació.

La GC-MS és l'eina d'anàlisi més freqüent per a la determinació i la identificació dels PBDEs i dels seus productes de degradació [Covaci, 2003]. Els avantatges més importants dels mètodes basats en GC-MS són:

- Altes sensibilitat i eficiència de separació.
- Elevat potencial d'identificació, gràcies a l'abundant informació estructural que proporcionen els espectres de masses.
- Possibilitat d'utilitzar biblioteques comercials d'espectres per a la identificació dels productes de transformació.

En aquesta tesi, tal com s'ha comentat anteriorment, GC-MS és la tècnica escollida per a la determinació del DecaBDE i dels seus productes de fotodegradació, a causa de la baixa solubilitat i el caràcter semivolàtil d'aquest compost parental i d'alguns dels potencials productes de degradació. Per aquest motiu, a continuació es comentaran alguns aspectes sobre la instrumentació i els mètodes més utilitzats en la identificació d'aquests compostos mitjançant GC-MS.

La majoria de les aplicacions en la determinació dels PBDES utilitzen columnes no polars o semipolars, com les de 100 % de metilpolisiloxà,

comercialment conegudes com DB-1, i les de 5 % de dimetilfenilpolisiloxans, comercialment conegudes com DB-5, CP-Sil 8 o AT-5. Generalment, les longituds de les columnes solen trobar-se entre 25 i 60 m i la mida de porus entre 0,25 i 0,32 μm . En el cas particular del BDE209, s'utilitzen columnes més curtes (10-15 m) i de mida de porus menor (0,1 μm), per tal de reduir el temps de residència en el sistema de GC, ja que aquest congènere és susceptible de ser degradat a altes temperatures [Eljarrat, 2007].

Per a obtenir espectres de masses del DecaBDE i dels seus fotoproductes, primer cal obtenir ions en fase gasosa. Es poden utilitzar dues tècniques d'ionització en GC-MS: l'impacte electrònic (EI) i la ionització química (CI). Les dues tècniques tenen característiques que les fan complementàries en la seva aplicació a la identificació de compostos desconeguts com és el cas dels compostos de degradació dels compostos en estudi.

La majoria dels mètodes utilitzats en la determinació dels PBDEs utilitzen GC-MS amb ionització d'impacte electrònic o font d'ionització química en mode negatiu (CNI). L'abundant fragmentació obtinguda en EI proporciona informació estructural útil per a l'elucidació de les estructures dels compostos, que un cop proposades poden ser confirmades mitjançant l'anàlisi dels patrons corresponents. Malgrat l'avantatge que presenten els espectres d'EI, en alguns casos la fragmentació és tan gran que no és possible determinar l'ió molecular, la qual cosa suposa una seriosa limitació en la identificació de compostos desconeguts. A més, no sempre es disposa de tots els patrons necessaris per a confirmar l'estructura de la molècula. Atès que l'assignació de l'ió molecular és essencial per a una correcta caracterització dels compostos, és recomanable l'ús de tècniques d'ionització toves, com CNI, que assegurin una correcta identificació dels compostos. És per aquest motiu que en la

present memòria s'ha escollit aquesta font d'ionització per a l'anàlisi del DecaBDE i dels seus productes de degradació.

La major part dels estudis aplicats a la identificació de PBDEs i dels seus productes de degradació empren analitzadors quadrupolars, tal com també s'ha fet en aquesta tesi. La popularitat d'aquests espectròmetres de masses ve del seu relatiu baix cost i de la seva simplicitat d'operació. Els analitzadors de tipus quadrupol poden ser considerats com un separador de masses i consisteixen bàsicament en quatre barres cilíndriques col·locades paral·lelament en forma radial (vegeu Figura 3.5). La idea és aplicar una combinació apropiada de corrent elèctric i de camp elèctric de radiofreqüència sobre aquestes barres per tal d'induir un moviment oscil·latori al flux d'ions que s'ha introduït en el sistema. Les trajectòries oscil·latòries d'aquests ions seran dependents de les seves masses i, d'aquesta manera, els ions es mouran seguint una seqüència ordenada cap al detector en funció de la seva relació m/z .

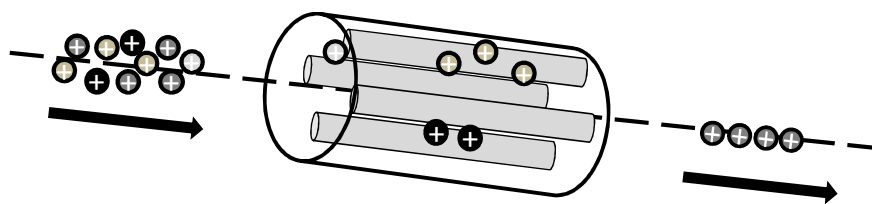


Figura 3.5. Esquema d'un quadrupol simple.

Els quadrupols simples han estat àmpliament utilitzats per a l'anàlisi dels retardants de flama mitjançant GC-MS perquè ofereixen una alta sensibilitat i robustesa, bona informació qualitativa i resultats quantitius adequats.

Per al seguiment cromatogràfic de la fotodegradació del DecaBDE es van enregistrar els TICs (*total ion chromatograms*). Un TIC és un cromatograma global, que s'obté a partir de la suma d'intensitats a cada temps d'elució de l'anàlisi cromatogràfica en l'interval de relacions m/z seleccionat. En la Figura 3.6 es mostren sis TIC corresponents a injeccions d'alíquotes recollides a diferents temps durant el procés de fotodegradació del DecaBDE. Podem observar com a temps zero apareix el pic corresponent al DecaBDE i dos pics més deguts a interferències del propi producte comercial. En els TIC de temps de procés posteriors es pot veure com apareixen un gran nombre de pics nous i com la intensitat del pic del DecaBDE va disminuint. Per tant, queda confirmada la degradació del DecaBDE per l'efecte de la llum.

En aquest cas, l'evolució cinètica del procés queda definida per l'evolució dels TIC amb el temps de procés. Cal tenir en compte que aquest tipus d'experiment ofereix menys informació cinètica que el seguiment clàssic per absorció molecular, ja que el nombre de temps de procés analitzat és més petit, però és més útil per a la diferenciació i caracterització dels compostos de degradació.

De la mateixa manera que les dades obtingudes en el seguiment per absorció molecular, les dades cromatogràfiques també s'han tractat amb mètodes quimiòmètrics, per tal de tenir un coneixement més ampli i minuciós sobre el problema en estudi.

Per a l'exportació de les dades cromatogràfiques generades a l'entorn MATLAB, es van utilitzar unes funcions matemàtiques facilitades pel Dr. Peter Harrington de la Universitat d'Ohio.

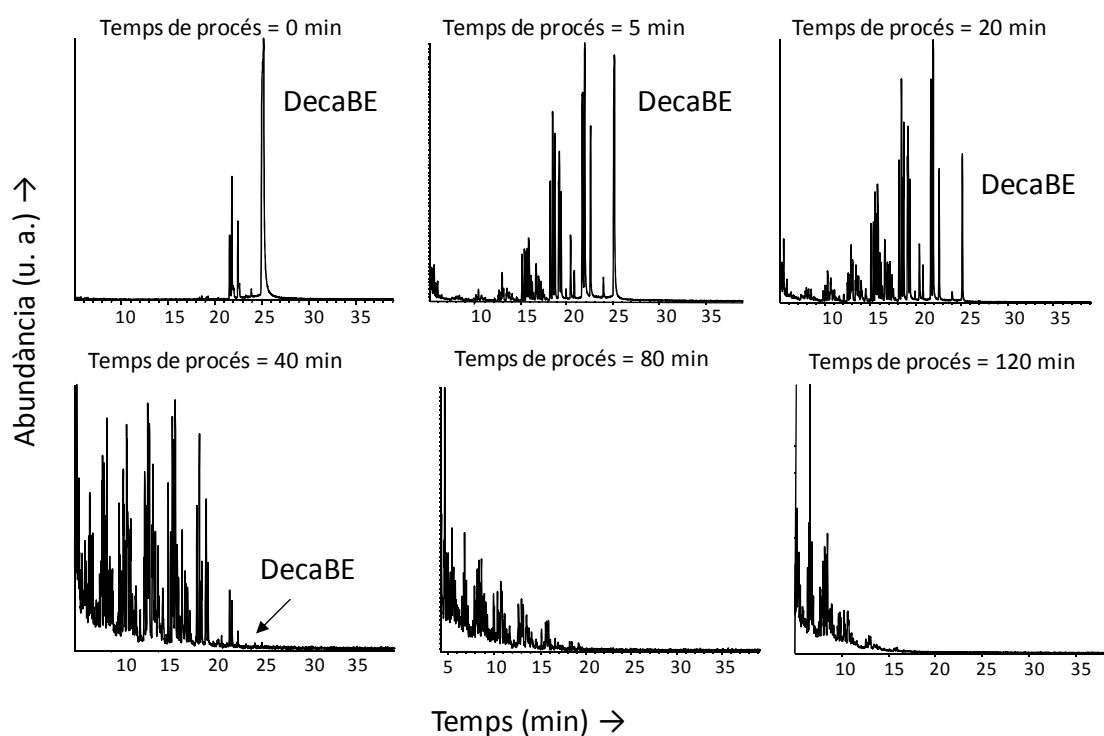


Figura 3.6. TIC corresponents a la injecció d'una sèrie d'alíquotes recollides a uns determinats temps del procés de degradació del DecaBDE.

El procediment experimental dels estudis de fotodegradació del DecaBDE es troba descrit amb més detall a l'article 5.2-I "*Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach*".

Cromatografia de líquids acoblada a un detector de díodes en sèrie i un espectròmetre de masses (HPLC-DAD-MS). Determinació dels bromofenols i dels seus productes de degradació.

HPLC-MS és la tècnica instrumental utilitzada en aquesta tesi per a la determinació dels bromofenols i dels seus productes de degradació. Els bromofenols són compostos d'escassa volatilitat; per tant, la seva anàlisi per GC-MS no seria directa i requeriria una etapa prèvia de derivatització. L'anàlisi per HPLC és una bona alternativa per a la determinació d'aquests compostos.

La cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses s'ha revelat en els últims anys com una eina de gran utilitat en la determinació d'una gran varietat de contaminants, entre ells alguns retardants de flama [Guerra, 2011]. Malgrat que aquesta tècnica ofereix menor resolució i limitada informació estructural en comparació amb GC-MS, presenta també importants avantatges, com són:

- Més facilitat per a analitzar compostos polars, d'escassa volatilitat i tèrmicament inestables.
- Possibilitat de realitzar l'anàlisi directa de les mostres i evitar d'aquesta manera les pèrdues derivades del procés de derivatització.

El recent desenvolupament de fonts d'ionització a pressió atmosfèrica (API), com la ionització d'electrosprai (ESI o ISP) o la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI), ha permès millorar la sensibilitat d'aquests sistemes i obtenir més informació estructural que amb les fonts d'ionització tradicionals (*thermospray* i *particle beam*). Com a conseqüència, ha crescut l'aplicació de la

tècnica de HPLC-MS en estudis de determinació de retardants de flama i dels seus compostos de degradació.

Un avantatge de l'ús de tècniques 'toves' d'ionització a pressió atmosfèrica és que permeten obtenir informació relativa al pes molecular dels compostos. Generalment, s'obté l'ió molecular protonat $[M + H]^+$ o adductes d'amoni $[M + H + NH_3]^+$ o de sodi $[M + H + Na]^+$ quan es treballa en mode positiu, i l'ió molecular desprotonat $[M-H]^-$ si es treballa en mode negatiu.

En contrapartida, quan s'utilitzen els sistemes API s'obté una limitada informació estructural. En general, l'estratègia més utilitzada per a proporcionar una millora en la informació estructural és l'ús de l'anàlisi de masses en tàndem mitjançant l'ús d'analitzadors com el triple quadrupol (QQQ) que és el que s'ha utilitzat en aquesta tesi.

Aquests sistemes consten bàsicament de tres quadrupols col·locats en sèrie, cadascun amb una funció diferent. El primer quadrupol s'utilitza per a fer l'escombratge d'un interval de m/z preseleccionat i aïllar un ió en particular. El segon quadrupol, també conegut com cel·la de col·lisió, focalitza i transmet els ions mentre s'aplica un gas (argó o heli) per a provocar la fragmentació per col·lisió induïda de l'ió precursor seleccionat. El tercer quadrupol serveix per a analitzar els fragments generats en la cel·la de col·lisió i eliminar els fragments neutres que s'han generat. En la Figura 3.7 es mostra un esquema senzill d'aquest analitzador.

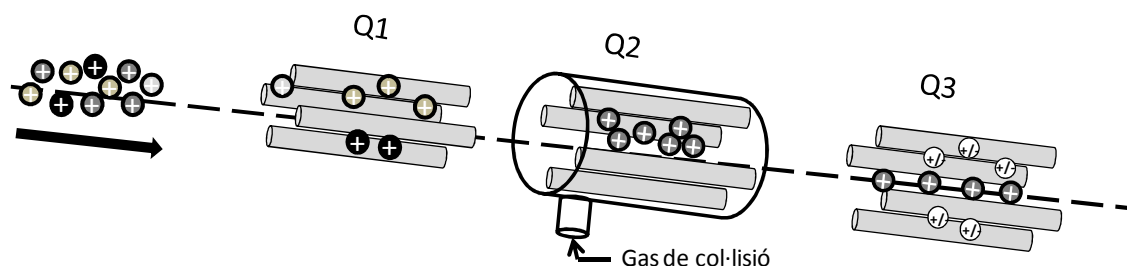


Figura 3.7. Esquema d'un analitzador triple quadrupol.

Els QqQ-MS s'han aplicat fonamentalment a l'anàlisi quantitativa de contaminants per l'elevada selectivitat i sensibilitat que proporcionen operant en mode de seguiment d'una reacció múltiple (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*). No obstant això, aquests instruments també proporcionen modes d'operació alternatius que poden ser útils per a la identificació de compostos desconeguts, com la cerca de pèrdues neutres (*neutral loss scan*), la cerca de l'ió precursor (*precursor-ion scan*) o la cerca d'ions producte (*product-ion scan*).

Tot i que recentment s'ha desenvolupat un mètode per a la determinació de 15 bromofenols de diferent grau de bromació mitjançant HPLC amb espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS) amb una font d'ionització d'electrosprai [Changa, 2010], la bibliografia sobre l'ús de tècniques de HPLC-MS per a l'anàlisi d'aquests compostos és molt escassa. Per aquest motiu i a causa de l'absència de precedents en el moment en què es va desenvolupar aquest estudi en la tesi es va adaptar un mètode ja establert per a l'anàlisi de clorofenols, compostos anàlegs als bromofenols. En aquest mètode, la font d'ionització utilitzada és una font d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI).

Per al seguiment cromatogràfic de la fotodegradació dels bromofenols es va utilitzar un cromatògraf de líquids amb detecció DAD-MS. La doble detecció (DAD-MS) es fa amb la finalitat d'aconseguir unes millors diferenciació i caracterització dels productes formats durant el procés.

Per a la separació cromatogràfica, es van provar diverses fases binàries d'aigua/metanol i aigua/acetonitril, però finalment es va optar per utilitzar una fase ternària. Aquesta fase va consistir en una mescla de dues solucions: la solució A, mescla de metanol (25 %) i acetonitril (75 %) i la solució B, solució reguladora aquosa de pH 3,5 feta amb una mescla d'acetat d'amoni/àcid acètic. La fase mòbil final es compon d'un 55 % de la solució A i un 45 % de la solució B. Aquesta fase ternària és una lleugera modificació de la utilitzada en la determinació de barreges de clorofenols, proposada per Sarrión i col·laboradors [Sarrión, 2003]. Aquesta fase mòbil es va triar ja que serveix per a separar bromofenols de diferent grau de bromació.

Per al seguiment cromatogràfic s'extreuen, aproximadament, una vintena d'alíquotes de la solució de degradació. Cadascuna d'aquestes mostres proporciona un cromatograma HPLC-DAD-MS. Tal com s'ha comentat anteriorment per als experiments de seguiment cinètic amb GC-MS, aquestes dades no proporcionen una informació cinètica tan detallada com els experiments de seguiment clàssic per absorció molecular, però són més indicades per a la identificació dels possibles compostos de degradació.

Per tal de tractar aquestes dades amb mètodes quimiomètrics, s'ha utilitzat un petit programa anomenat Databridge, que hi ha en el mateix programari MassLynx. Aquest programa converteix les dades HPLC-DAD-MS en arxius de format ASCII. Finalment, aquests arxius es converteixen en arxius llegibles

en l'entorn MATLAB mitjançant una rutina escrita pel nostre grup d'investigació. A partir d'aquesta rutina s'obtenen dues matrius de dades per cada cromatograma, una corresponent a les dades de HPLC-DAD i l'altra corresponent a les dades de HPLC-MS, respectivament.

HPLC-DAD-MS és una molt bona tècnica instrumental per al seguiment de processos de degradació. A més, és una eina més adequada per al seguiment de sistemes complexos (amb un gran nombre de productes de degradació o amb productes de degradació amb espectres UV similars o evolucions cinètiques molt paregudes) que el seguiment per absorció molecular UV. Les dades HPLC-DAD donaran una idea sobre l'evolució cinètica dels productes de degradació i les dades HPLC-MS donarà els espectres de MS que ens ajudaran a la caracterització i identificació d'aquests productes.

El procediment experimental dels estudis de fotodegradació dels bromofenols es troben descrits amb més detall a l'article 5.3-I "*Comprehensive description of the photodegradation of bromophenols using chromatographic monitoring and chemometric tools*" i a l'article 5.3-II "*Study of the photodegradation of 2-bromophenol under uv and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques*".

3.2. PROCESSOS DE BIODEGRADACIÓ

La metabolització *in vitro* del DecaBDE es va dur a terme mitjançant incubacions amb microsomes. Els microsomes utilitzats en aquesta tesi van ser microsomes de fetge de rata Sprague Dawley tractats amb:

- 1.- β -naftoflavona per a induir els enzims CYP1A.
- 2.- Fenobarbital per a induir els enzims CYP2B.
- 3.- Clofibrat per a induir l'enzim CYP3A4.

Aquests enzims ja han estat descrits en la bibliografia com a responsables del metabolisme d'alguns PBDEs i és per aquest motiu que s'han escollit per a l'estudi del metabolisme del DecaBDE. A més, el CYP3A4 és l'enzim més abundant en el fetge humà i un dels principals responsables del metabolisme dels xenobiòtics. Als enzims CYP1A i els CYP2B se'ls relaciona amb el metabolisme dels compostos aromàtics.

El procediment de treball que s'ha seguit és un proposat per Meerts i col·laboradors [Meerts, 2000] per a la metabolització *in vitro* d'altres PBDEs però amb lleugeres modificacions. Consta de les següents etapes:

1. Incubació de la solució de DecaBDE amb els microsomes hepàtics induïts i solució tampó (Tris 100 mM pH = 7,4) en un bany d'aigua a 37 °C amb agitació constant durant 5 minuts.
2. Iniciació de la reacció mitjançant l'addició del sistema regenerador dependent del nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduïda (NADPH).
3. Finalització de la metabolització després de 30, 60 i 120 minuts amb l'addició de metanol en fred.

4. Extracció de la fase aquosa i de la fase orgànica amb l'addició d'isopropilèter.
5. Evaporació dels residus orgànics sota corrent de N_2 , reconstitució amb hexà i injecció en el sistema cromatogràfic GC-MS.
6. Evaporació dels residus anteriors i dels residus aquosos sota corrent de N_2 , reconstitució amb metanol i injecció en el sistema cromatogràfic HPLC-MS/MS.

Per tal de corregir les possibles pèrdues en el procediment d'extracció, després d'aturar la reacció amb metanol gelat (pas 3), s'afegeix el patró intern PCB209.

Per tal de determinar la possible transformació del DecaBDE que no sigui mediada pel sistema de NADPH, es van dur a terme incubacions de mostres control. Aquestes incubacions de les mostres control es van dur a terme de la mateixa manera que les incubacions anteriors, però afegint $NaHCO_3$ al 2 % en lloc del sistema regenerador dependent del NADPH (NSR).

A més, per tal de determinar la possible degradació abiòtica del DecaBDE, es van dur a terme 3 incubacions addicionals sense microsomes.

La Figura 3.8 mostra un esquema resum del procediment de treball que s'ha realitzat.

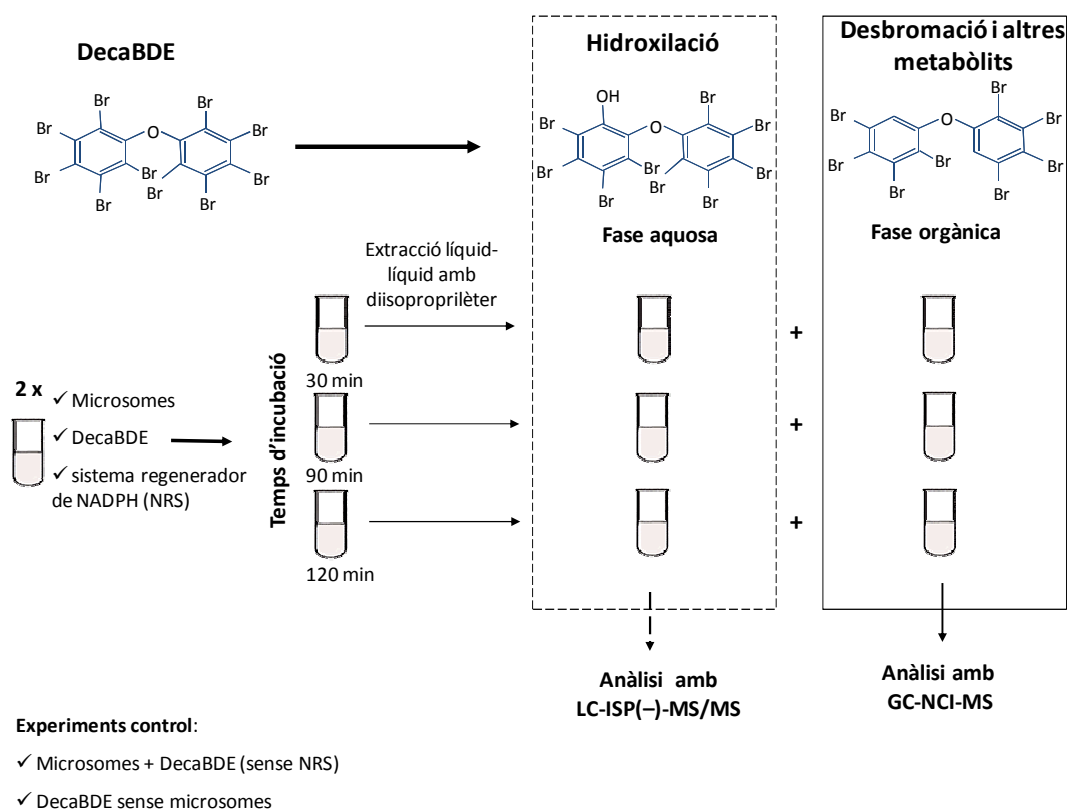


Figura 3.8. Esquema resum del procediment experimental per a l'estudi del metabolisme *in vitro* del DecaBDE.

Com es pot observar en la Figura 3.8 i pels estudis trobats en la bibliografia, els possibles productes de biotransformació del DecaBDE són compostos de desbromació (o altres metabòlits tals com els compostos de metoxilació) que s'analitzaran per GC-MS i els compostos d'hidroxilació (OH-PBDEs) que s'analitzaran per HPLC-MS.

Les condicions cromatogràfiques i els paràmetres de l'espectròmetre de masses escollits per a analitzar aquests productes de biotransformació, així com una descripció més minuciosa sobre el procediment experimental de biodegradació es troben en l'article 5.2-III "*In vitro metabolism of decabromo diphenyl ether using rat microsomes*".

Recentment s'han desenvolupat dos mètodes per a la determinació dels OH-PBDEs mitjançant HPLC-MS/MS [Changa, 2010; Lupton, 2010]. Malgrat això, durant l'elaboració d'aquesta tesi i segons el nostre coneixement, els derivats hidroxilats dels PBDEs (OH-PBDEs), només havien estat determinats per GC amb derivatització dels compostos prèvia a la seva injecció. Per tant, amb la finalitat de trobar una alternativa, en aquesta tesi es va establir una nova metodologia d'anàlisi mitjançant HPLC-MS/MS per a vuit OH-PBDEs, la qual no requereix l'etapa de derivatització. Aquests compostos han estat estudiats en quatre mostres ambientals (sòl agrícola, fang de depuradora, Ciprius Carpio i matèria particulada). A continuació es farà una breu descripció dels materials i mètodes utilitzats per establir aquesta nova metodologia. Una descripció més detallada sobre aquesta metodologia es troba en l'article 5.2-II "*Comprehensive Liquid Chromatography-Ionspray Tandem Mass Spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices*".

3.2.1. ANÀLISI DELS PRODUCTES D'HIDROXILACIÓ MITJANÇANT CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS AMB ESPECTROMETRIA DE MASSES

El cromatògraf de líquids que es va utilitzar per a establir la metodologia d'anàlisi dels OH-PBDEs va ser un Agilent 1100 series (Waldbronn, Germany) acoblat a un espectròmetre de masses en tàndem. El detector de masses és un triple quadrupol API 3000 (PE Sciex, Concord, ON, Canada).

Per les característiques d'aquests compostos (entre d'altres el pKa que és aproximadament 8) la font d'ionització més adequada és l'electrosprai (ISP)

en mode negatiu. Tot i així es van provar també ISP en mode positiu i APCI en mode negatiu i positiu per a tenir en consideració totes les possibilitats.

Per a separar els OH-PBDEs es van provar tres columnes de fase enllaçada. Inicialment i com a procediment normal es va començar provant les columnes C₁₈ i com els patrons no se separaven adequadament es va provar una columna de tipus fenil:

Les columnes C₁₈ utilitzades van ser:

- Discovery HS C₁₈ (Supelco) de 50 mm de llargada × 2,1 mm de diàmetre intern × 3,5 µm de tamany de partícula. Aquesta columna presenta una alta reproductibilitat i és molt estable.
- XBridge C18 column (Waters) de 50 mm de llargada × 2,1 mm de diàmetre intern × 3,5 µm de tamany de partícula. Aquesta columna és molt utilitzada en el desenvolupament de mètodes robustos en tot l'interval de pH i en una variada gamma de fases mòbils i temperatures.

La columna fenil utilitzada va ser:

- XTerra phenyl (Waters) de 50 mm de llargada × 2,1 mm de diàmetre intern × 3,5 µm de tamany de partícula. Les columnes XTerra combinen les millors propietats de la sílice i els materials polimèrics, que donen robustesa i permeten treballar a altes temperatures i velocitats i a valors de pH elevats. A més proporcionen pics estrets.

Per a establir la separació cromatogràfica òptima, es van provar diverses fases mòbils, tals com fases binàries amb diferents programes d'elució i proporcions de solvent A (tampó acetat d'amoni/àcid acètic 5 mM) i solvent B (metanol o acetonitril). La separació es va millorar mitjançant fases ternàries amb diferents programes d'elució i proporcions de solvent A (tampó acetat d'amoni/àcid acètic 5 mM o acetat d'amoni/àcid acètic 5 mM amb 2 % de 2-propanol, 2 % d'acetona o 2 % 1-metoxi-2-propanol), solvent B (metanol) i solvent C (acetonitril), ja que milloraven la força elutropica.

En espectrometria de masses, tal com s'ha comentat anteriorment l'estratègia més utilitzada per a proporcionar una millora en la informació estructural és l'ús de l'anàlisi de masses en tàndem mitjançant l'ús d'analitzadors com el triple quadrupol (QqQ) que és el que s'ha utilitzat també per a desenvolupar aquesta metodologia. Es va operar en mode de seguiment d'una reacció múltiple (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*).

Un cop establerta la metodologia analítica HPLC-MS/MS per a la determinació dels OH-PBDEs, es van injectar els extractes de la fase aquosa obtinguts en el metabolisme del DecaBDE per tal de determinar si s'havien format productes d'hidroxilació.

3.3. BIBLIOGRAFIA

[Changa, 2010]

H. Changa, Y. Wana, J. Nailea, X. Zhanga, S. Wisemana, M. Heckera, M. H.W. Lamc, J.P. Giesya, P. D. Jonesa. *Simultaneous quantification of multiple classes of phenolic compounds in blood plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. J. of Chromatogr. A 1217 (2010) 506.

[Covaci, 2003]

A. Covaci, S. Voorspoels, J. de Boer. *Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples—a review*. Environ. Int. 29 (2003) 735.

[Eljarrat, 2007]

E. Eljarrat, A. Labandeira, G. Marsh, D. Raldua, D. Barcelo. *Decabrominated ether in river fish and sediment samples collected downstream and industrial park*. Chemosphere 8 (2007) 1278.

[Guerra, 2011]

P. Guerra; E. Eljarrat; D. Barceló. *Determination of halogenated flame retardants by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. TrAC Trend. Anal. Chem. 30 (2011) 842.

[Lupton, 2010]

S.J. Lupton, B. P. McGarrigle, J.R. Olson, T.D. Wood, D.S. Aga. *Analysis of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Sp. 24 (2010) 2227.

[Meerts, 2000]

I.A.T.M. Meerts, J.J. van Zanden, E.A.C. Luijks, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, A. Brouwer. *Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro*. Toxicol. Sci., 56 (2000) 95.

[Sarrion, 2003]

M.N. Sarrión, F.J. Santos, E. Moyano, M.T. Galceran. *Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the analysis of chlorophenols in environmental samples*. Rapid Commun. Mass Sp. 17 (2003) 39.

CAPÍTOL 4:

Tractament de dades

Les dades obtingudes en els processos de fotodegradació han estat tractades amb mètodes quimiomètrics. L'objectiu de l'aplicació dels mètodes quimiomètrics és extraure la informació rellevant que es troba en aquestes dades i obtenir una millor interpretació química dels processos de degradació.

4.1. ESTRUCTURA DE LES DADES EN PROCESSOS QUÍMICS

Les tècniques espectroscòpiques i cromatogràfiques emprades en aquesta tesi ens proporcionen respostes multivariants; és a dir, els espectres o cromatogrames que s'obtenen estan formats per un conjunt de valors numèrics que contenen la informació sobre la mostra estudiada (absorbàncies a diferents longituds d'ona en el cas d'un espectre o l'evolució d'una absorbància a diferents temps de retenció en el cas d'un cromatograma).

La informació d'un sol espectre o cromatograma es pot presentar en forma de vector; en canvi, la d'un conjunt d'espectres recollits durant un procés o la d'un cromatograma en què el detector recull un espectre complet a cada temps de retenció es pot presentar en forma de matriu (***D***) (vegeu Figura 4.1).

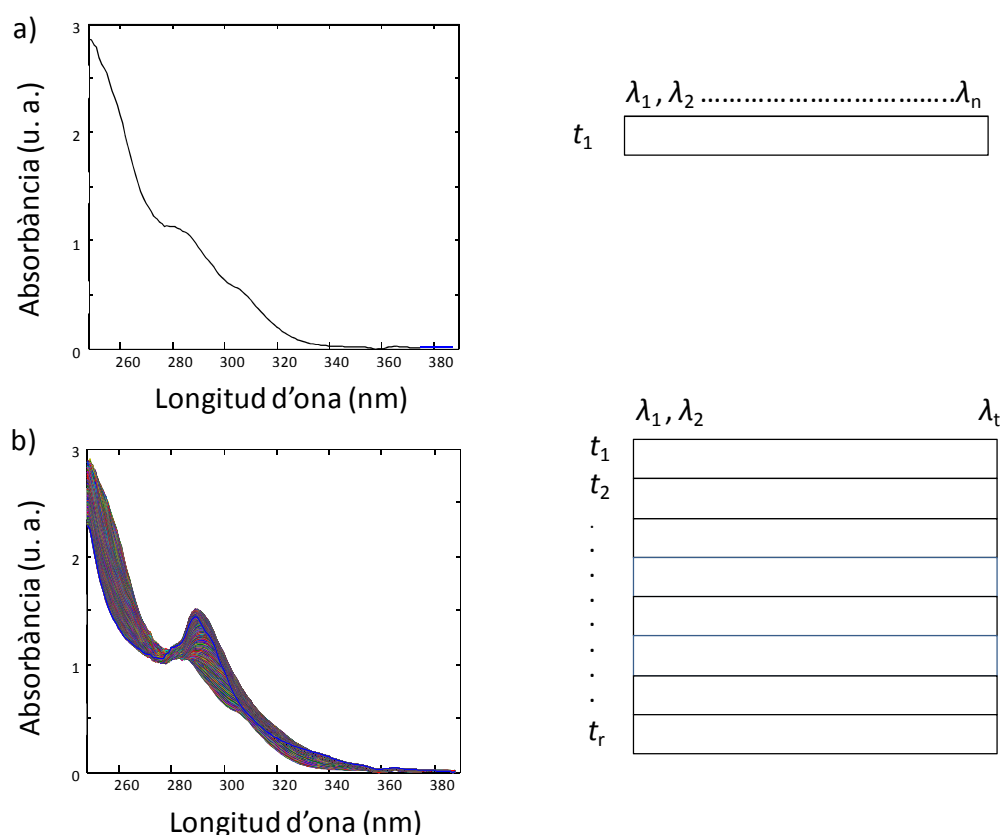


Figura 4.1. (a) Espectre i la seva representació en forma de vector. (b) Conjunt d'espectres recollits durant un procés i la seva representació en forma de matriu.

A més, moltes vegades, el seguiment d'un procés proporciona diverses matrius de dades. Per exemple, en el seguiment cromatogràfic d'un procés de fotodegradació s'obtenen tantes matrius de dades (cromatogrames i espectres acoblats) com temps de procés estudiats. La recopilació de totes aquestes matrius de dades, que proporciona la informació del procés, es pot ordenar de diferents maneres i dona lloc a estructures multiexperiment o multitècnica (*multiset structures*) en què les dades s'ordenen en matrius augmentades (\mathbf{D}_{aug}). Una matriu augmentada \mathbf{D}_{aug} està formada per diverses matrius més senzilles i

pot tenir diferents estructures segons la direcció (o direccions) de l'augmentació.

Matriu augmentada en la direcció de les files.

En aquesta opció, les diferents matrius individuals tenen el mateix nombre de files, amb mateix significat químic (per exemple, els mateixos temps d'elució), mentre que poden tenir diferent nombre de columnes i, a més, de significació diversa. Un exemple d'aquest tipus d'augmentació seria la d'un cromatograma amb detecció simultània DAD i MS, on cadascun dels sistemes de detecció produeix una matriu de dades (HPLC-DAD o HPLC-MS). Aquestes matrius es poden acoblar aprofitant la direcció comuna de les files (vegeu Figura 4.2-a).

Matriu augmentada en la direcció de les columnes.

Per a utilitzar aquesta opció tots els experiments han d'haver estat seguits amb la mateixa tècnica. Cal que les matrius tinguin el mateix nombre de columnes i que el seu significat químic sigui idèntic en cadascuna de les matrius acoblades, però el nombre de files i la seva significació química poden diferir. Aquest seria el cas de l'experiment de seguiment cromatogràfic d'un procés en què tots els cromatogrames obtinguts amb un mateix sistema de detecció a diferents temps de procés es tracten conjuntament, encara que l'interval de temps d'elució i el patró d'elució dels compostos en els cromatogrames sigui diferent. En aquest cas, les matrius s'acoblen aprofitant la direcció comuna de les columnes (vegeu Figura 4.2-b).

Matriu augmentada en la direcció de les files i de les columnes.

En aquest cas, les matrius s'acoblen entre elles aprofitant la direcció comuna de les files i la direcció comuna de les columnes entre els experiments. Un exemple correspondria a tractar els cromatogrames de l'experiment cromatogràfic de seguiment d'un procés amb els 2 sistemes de detecció (vegeu Figura 4.2-c).

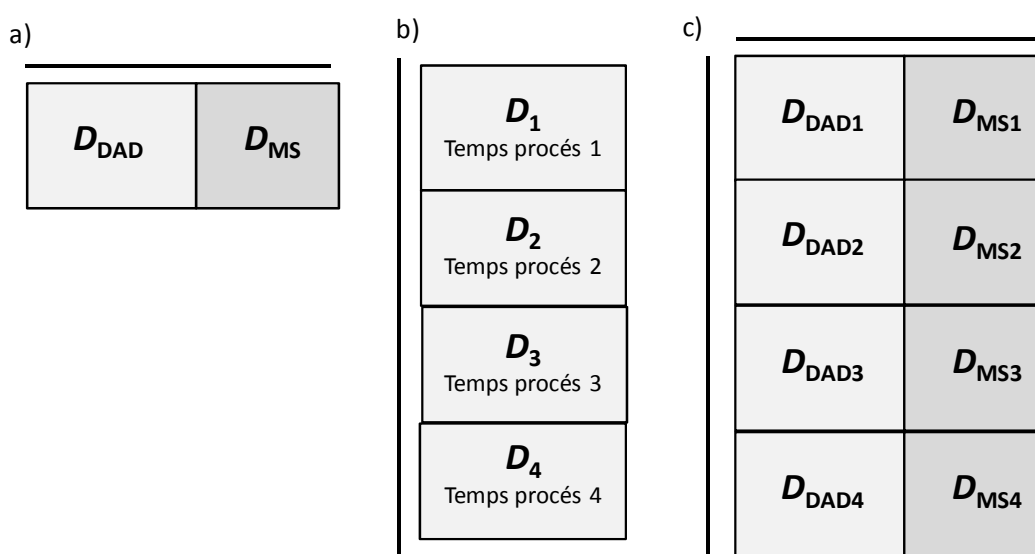


Figura 4.2. Estructures d matrius augmentades en els processos químics. (a) Matriu augmentada en la direcció de les files, (b) Matriu augmentada en la direcció de les columnes i (c) Matriu augmentada en la direcció de les files i de les columnes. Les línies horitzontals i verticals representen la direcció (o direccions) de l'augmentació.

S'Anomena matriu D la que descriu les observacions obtingudes en els experiments de laboratori, ja sigui mitjançant una sèrie d'espectres o d'un cromatograma. Aquesta matriu té dimensions $m \times n$. Per exemple, en la matriu formada pel conjunt d'espectres UV recollits a diferents temps de procés, m correspon al nombre de temps de procés i n al nombre de longituds d'ona presents a cada espectre. Cada fila d'aquesta matriu conté l'espectre UV

enregistrat a un determinat temps de procés J i cada columna una traça cinètica, és a dir, l'evolució de l'absorbància en funció del temps de procés a una determinada longitud d'ona I (vegeu Figura 4.3). La matriu \mathbf{D} conté tota la informació relativa al procés en estudi.

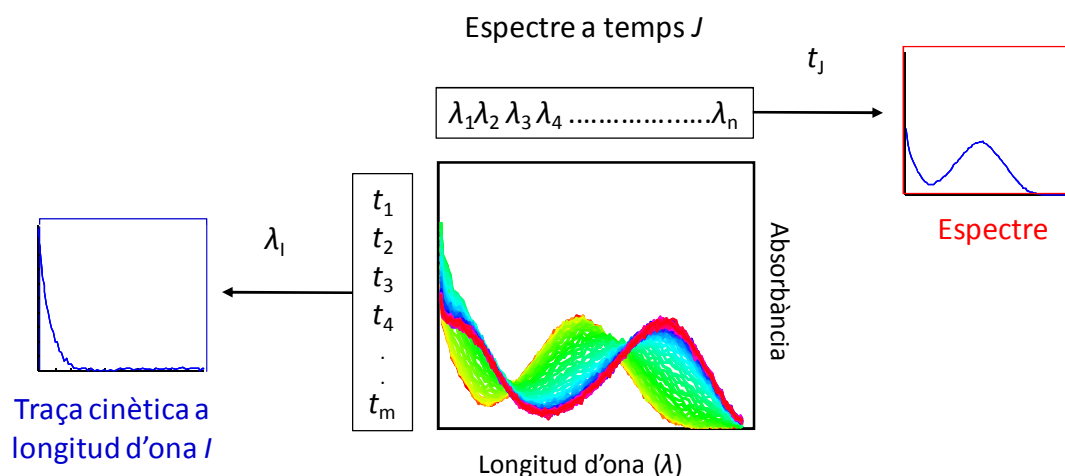


Figura 4.3. Representació gràfica de l'ordenació de les dades experimentals per al cas del seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular. Les files representen els espectres UV enregistrats durant el procés i les columnes representen la variació del senyal en funció del temps a les diferents longituds d'ona.

Les respostes instrumentals de les tècniques utilitzades en aquesta tesi segueixen un model de tipus bilineal igual a la generalització matricial de la llei de Beer-Lambert. En forma matricial, aquest model bilineal s'escriu de la següent manera:

$$\mathbf{D}_{(m,n)} = \mathbf{C}_{(m,nc)} \mathbf{S}_{(nc,n)}^T + \mathbf{E}_{(m,n)} \quad \text{Equació 4.1}$$

on: \mathbf{D} és la matriu de dades experimentals que conté els espectres del procés,

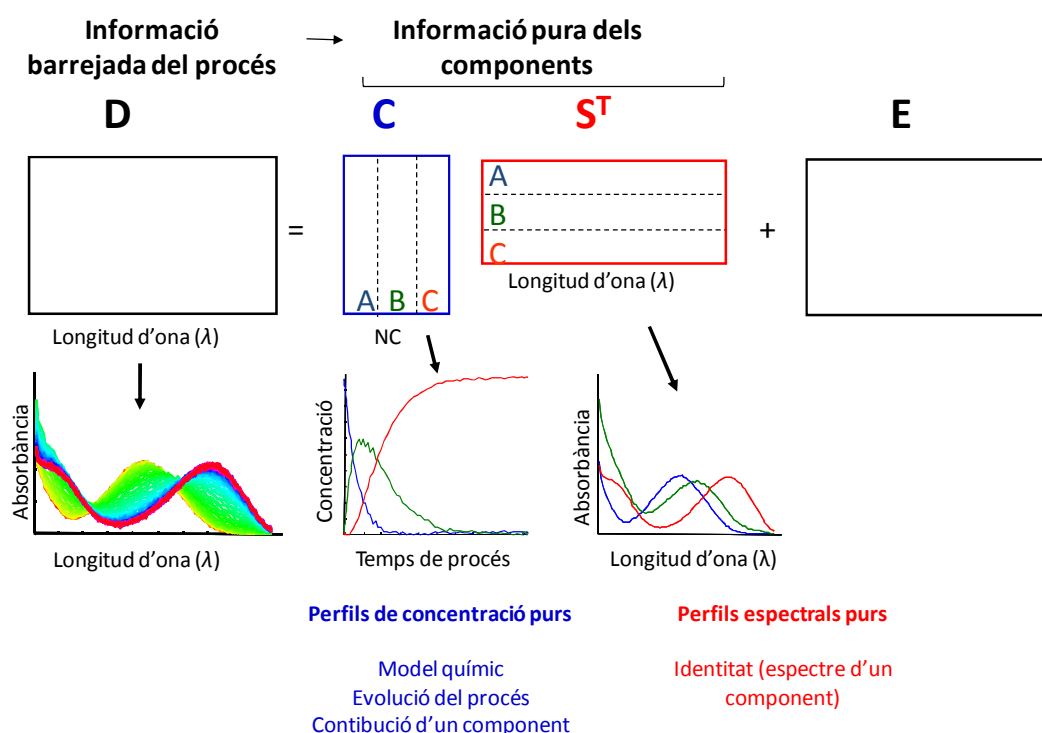
C és la matriu dels perfils de concentració dels diferents compostos que participen en el procés.

S^T és la matriu d'espectres purs associats a cadascun dels compostos presents en el procés.

E és la matriu residual que inclou la variació no explicada pel model bilineal de l'Equació 4.1. Si el sistema està ben descrit per aquest model lineal, E ha d'ésser d'una magnitud similar a l'error experimental associat a les condicions particulars de mesura en l'experiment.

m és el nombre d'espectres analitzats, n és el nombre de longituds d'ona cada espectre, nc és el nombre de compostos que participen en el procés i que tenen resposta espectral.

La representació gràfica de l'equació 4.1 per al cas del seguiment cinètic per absorció molecular es mostra a la Figura 4.4. La matriu D que conté la informació del procés (espectres enregistrats als diferents temps de procés), es pot descriure mitjançant les contribucions pures (perfils de concentració, C , i espectres, S^T) de les espècies presents en el procés.



NC = Número de components

Figura 4.4. Representació en forma matricial de les dades experimentals corresponents al seguiment cinètic per absorció molecular.

Per a il·lustrar el significat del model bilineal de l'equació 4.1 i l'organització de les dades experimentals s'ha pres com a referència l'experiment de seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular. Les explicacions donades, però, també són aplicables a un cromatograma, substituint el significat de les files per temps d'elució i el de les columnes per longituds d'ona (en detecció DAD) o relacions m/z (en detecció MS). Aquest model bilineal també s'aplica a les matrius augmentades D_{aug} , tal com s'explicarà més endavant (vegeu apartat 4.4.2.4).

Un cop definides l'organització, l'estructura i el comportament de les dades experimentals, s'explicaran les metodologies per a l'obtenció de les matrius S^T

i C del model bilineal a partir de la matriu senzilla D o augmentada D_{aug} . Però, prèviament es descriuen els pretractaments de les dades que s'han dut a terme per tal de millorar la qualitat de la mesura que es vol analitzar.

4.2. TRACTAMENT PRELIMINAR DE LES DADES

Abans de procedir a l'anàlisi de les dades, és convenient fer certs tractaments previs, per tal d'obtenir senyals de millor qualitat i d'una grandària adequada. L'alt nivell de soroll (en HPLC-MS) i les irregularitats en la forma de la línia de base en cromatografia són problemes típics que deteriorenen els senyals originals de les dades experimentals. A més de millorar la qualitat de la mesura, el tractament previ de les dades també resulta necessari, sovint, per a reduir la mida de les dades i d'aquesta manera facilitar-ne la manipulació i reduir-ne el temps d'anàlisi. A continuació es descriuen els tractaments previs que s'han realitzat a les dades obtingudes en la present memòria.

4.2.1. COMPRESSIÓ DE LES DADES EN LA DIRECCIÓ DE LA RESPOSTA

Per tal de reduir la mida de les matrius procedents de cromatogrames, se selecciona l'interval espectral o l'interval de relacions massa/càrrega (m/z) d'interès. En el cas dels experiments amb detecció DAD, s'eliminen aquelles longituds d'ona on absorbeixen els solvents i solucions reguladores (generalment 190-205 nm) i les longituds d'ona més altes (a partir de 400 nm) on els compostos d'interès ja no absorbeixen.

En el cas de les dades de HPLC-MS, com que el nombre de canals dels espectres de masses és força gran i molts d'ells no aporten informació, les

dades es comprimeixen abans de procedir-ne a l'anàlisi. Generalment, la compressió es duu a terme en la direcció espectral i un dels procediments més senzills i sovint utilitzat és el *binning*. El terme *binning* significa sumar lectures d'un interval de canals espectrals veïns per a formar una sola mesura (compressió espectral). Existeixen altres mètodes que, a més de comprimir la matriu, filtren part del possible soroll (no informació química) present a les dades experimentals, com són les transformades de wavelets (de l'anglès *wavelet transform*) [Walczak, 2000]. En aquesta tesi, la compressió de les dades s'ha efectuat seleccionant els canals útils en funció de la intensitat del senyal mesurat. En general, el soroll té un senyal molt inferior al senyal amb informació química. Aleshores, a partir de l'espectre mitjà, es pot seleccionar un valor llindar d'intensitat, per sota del qual el senyal es considera carent d'informació i s'elimina. El resultat d'aquest pretractament és l'obtenció d'una matriu que només conté informació química i és de dimensió més petita. D'aquesta manera, només mantenint les relacions m/z per a les quals la intensitat supera el 0,8-2 % del canal de màxima intensitat de la matriu, es pot passar de 580 canals espectrals a un interval entre 90 i 190 canals (depenent de la mostra) sense perdre informació química i eliminant molts canals que no aporten informació útil. La selecció del valor llindar es fa de forma visual i sempre es comprova que, en les dades comprimides, no s'hagi perdut cap dels pics cromatogràfics apreciables en el cromatograma mitjà de la mesura original.

4.2.2. CORRECCIÓ DE LA LÍNIA DE BASE O DEL SENYAL DE FONS

L'algoritme de mínim quadrats asimètrics (de l'anglès *asymmetric least-squares*, *AsLS*) s'ha utilitzat per a corregir la línia de base dels cromatogrames. Aquest

mètode és especialment adequat per a corregir les línies de base d'aquells conjunts de dades en què el senyal significatiu (pics) és molt més estret que la contribució de la línia de base, com són les dades cromatogràfiques [Eilers, 2004, 2005].

Aquest algoritme es basa en un ajustament iteratiu del cromatograma mitjançant una funció local basada en el filtre de Whittaker. En la primera iteració, tots els punts del cromatograma tenen el mateix pes en l'ajust, amb la qual cosa una part del cromatograma queda per sobre de la línia de base ajustada (residuals positius) i una altra per sota (residuals negatius). En les successives iteracions es penalitzen els punts del cromatograma per sobre de la línia de base ajustada (amb residuals positius) fins que s'arriba a la convergència de l'ajust. La línia de base ajustada es resta del cromatograma original per a obtenir, d'aquesta manera, el cromatograma corregit. Aquest algoritme presenta dos paràmetres que ajuden a adaptar l'ajust de la línia de base a les dades d'interès. Aquests paràmetres fan referència a la suavització de l'ajustament (el factor de suavització, λ) i a la penalització dels residuals positius (factor d'asimetria, p). El factor d'asimetria ($0 < p < 1$) determina el pes relatiu dels residuals negatius i positius. Si p és proper a zero, als residuals positius se'ls dona molt menys pes que als residuals negatius. En la figura 4.5 es pot veure un exemple d'un cromatograma HPLC-DAD abans i després d'aplicar la correcció de línia de base per mínim quadrats asimètrics. L'avantatge d'aquesta correcció és que, com es basa en l'ajust d'una funció local no assumeix cap forma global predeterminada per a la línia de base (per exemple un polinomi) i s'adapta a formes molt irregulars. La correcció de línia de base mitjançant AsLS s'aplica individualment a cada columna (cada λ) de la matriu de dades de HPLC-DAD.

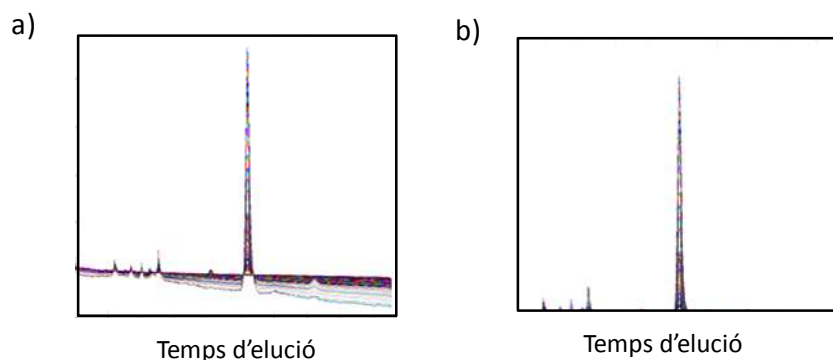


Figura 4.5. (a) Cromatograma de HPLC-DAD original, (b) Cromatograma de HPLC-DAD després de la correcció de la línia de base mitjançant AsLS.

4.3. MÈTODES D'ANÀLISI MULTIVARIANT DE PROCESSOS QUÍMICS

El principal objectiu dels mètodes d'anàlisi multivariant de processos basats en un model bilineal és el càlcul de les matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T a partir de l'anàlisi de la matriu experimental \mathbf{D} . És a dir, resoldre la informació que conté la matriu de dades experimentals recollides durant el procés (\mathbf{D}) com a suma de les contribucions de cadascun dels components químics que hi participen. Aquestes contribucions es troben representades a través dels perfils de concentració (\mathbf{C}) i dels espectres purs (\mathbf{S}^T), que proporcionen informació sobre l'evolució de la concentració dels components implicats en el procés i sobre la seva identitat, respectivament.

Hi ha dues famílies de mètodes quimiomètrics basats en l'anàlisi multivariant que es poden utilitzar per a resoldre el model bilineal que descriu un procés expressat en l'equació 4.1. La primera família la formen aquells mètodes que fan servir un model determinista químic (basat en les lleis fonamentals fisicoquímiques) per a definir els perfils de concentració del procés i es

coneixen com a mètodes de modelització rígida (de l'anglès *hard-modelling*) [Maeder, 1990,2007, 2009; Mauser,1998]. La segona família de mètodes no fa servir cap model químic explícit en el càlcul dels perfils de concentració del procés en els espectres associats, sinó propietats generals dels perfils de concentració i de les respostes químiques per a definir la forma de les contribucions de cada component en el procés analitzat i s'anomenen mètodes de modelització flexible (de l'anglès *soft-modelling*) [de Juan, 2000a, 2009].

Hi ha un nou tipus de mètodes, que es coneixen com a mètodes de modelització híbrida rígida i flexible (de l'anglès *hybrid hard- and soft-modelling*), que són els que fan servir un model químic (modelització rígida) combinat amb les característiques naturals dels perfils de concentració o de resposta, pròpies dels mètodes de modelització flexible, i d'aquesta manera aprofiten simultàniament els avantatges d'ambdues modelitzacions [de Juan, 2000b, 2001, 2009; Bezemer, 2001].

4.3.1. MÈTODES DE MODELITZACIÓ RÍGIDA

Aquests mètodes tenen com a objectiu descriure la variació de les mesures obtingudes durant un procés mitjançant un model determinista químic, definit per una sèrie de paràmetres (per exemple, constants d'equilibri o cinètiques) que descriuen l'evolució del procés investigat [Marcel, 2009]. Per tant, s'orienten a obtenir els valors dels paràmetres del procés (per exemple, les constants de fotodegradació) que defeneixen els perfils de concentració, \mathbf{C} , dels components o constituents i les contribucions espectrals associades de la matriu \mathbf{S}^T de tal forma que les dades experimentals de la matriu \mathbf{D} s'ajustin de manera òptima [Gans, 1992]. En aquesta tesi, només les dades obtingudes en

el seguiment per absorció molecular poden ser resoltes per aquests mètodes, ja que les dades cromatogràfiques no es poden descriure a partir de cap model químic de tipus determinista.

Per tal de modelar la matriu de dades experimentals (\mathbf{D}) a partir d'aquests mètodes se segueixen els següents passos:

1. Elecció del model químic que millor descriu les dades experimentals.
2. Eliminació dels paràmetres lineals que defineixen la matriu \mathbf{S}^T .
3. Optimització dels paràmetres no lineals que defineixen la matriu \mathbf{C} de perfils de concentracions.

A continuació, es farà una breu descripció de cadascuna d'aquestes etapes.

4.3.1.1. ELECCIÓ DEL MODEL QUÍMIC

El model químic defineix, essencialment, l'evolució de les concentracions de les espècies químiques que participen en un procés en funció de la variable que el defineix (temps, pH,...). En la present memòria s'estudien processos de seguiment cinètic, amb què s'analitza l'evolució d'un sistema químic en funció del temps (procés de fotodegradació).

Els sistemes químics cinètics són definits per un conjunt d'equacions diferencials de complexitat variable. En els casos més simples, els perfils de concentracions de la matriu \mathbf{C} es poden calcular a partir d'equacions explícites que relacionen la concentració amb el temps. Així, en el cas d'un sistema de reaccions consecutives de primer ordre: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ es defineixen el següent

conjunt d'equacions diferencials de primer ordre (de l'anglès *ordinary differential equations*, *ODEs*):

$$\begin{aligned}\frac{d[A]}{dt} &= -k_1[A] \\ \frac{d[B]}{dt} &= k_1[A] - k_2[B] \\ \frac{d[C]}{dt} &= k_2[B]\end{aligned}\quad \text{Equacions 4.2}$$

La integració d'aquest sistema d'ODEs ens proporciona l'expressió de la concentració per a cada espècie química en funció del temps:

$$\begin{aligned}[A] &= [A]_0 e^{-k_1 t} \\ [B] &= [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (\text{si } [B]_0, [C]_0 = 0, k_1 \neq k_2) \\ [C] &= [A]_0 - [A] - [B]\end{aligned}\quad \text{Equacions 4.3}$$

El nombre de mecanismes de reacció per als quals es disposa de solucions analítiques explícites (que relacionen matemàticament les concentracions dels constituents amb el temps) és molt reduït. Es limiten a mecanismes que segueixen reaccions de primer i segon ordre [Espenson, 1995]. Per tant, en general, s'utilitzen mètodes d'integració numèrica per a calcular els valors de les concentracions a partir de les equacions diferencials ordinàries corresponents [Stoer, 1993]. Malauradament, hi ha molts processos per als quals es desconeix el mecanisme de reacció correcte. Així, la determinació del

model correcte per a l'ajust de les dades (**D**) serà, sense dubte, la tasca més difícil en aquests mètodes de modelització rígida. Els mètodes de modelització rígida solen proporcionar solucions adequades per als sistemes en què és possible postular un model químic fiable. Però, en molts casos, quan no es té un coneixement previ apropiat del sistema, l'ajust de les dades experimentals a un determinat model pot ser una tasca força complexa (vegeu secció 4.4.1.5) i, en casos d'alta complexitat, pot haver-hi models diferents que proporcionin descripcions de les dades experimentals igualment plausibles.

4.3.1.2. ELIMINACIÓ DELS PARÀMETRES LINEALS

En l'anàlisi de processos químics mitjançant la combinació d'un model bilineal i un model rígid hi ha dos tipus de paràmetres a optimitzar, els paràmetres no lineals i els paràmetres lineals. Generalment, els paràmetres que defineixen el model químic, (per exemple, constants cinètiques o d'equilibri) que s'han d'obtenir a partir d'una optimització no lineal són paràmetres no lineals i els paràmetres que es relacionen amb la resposta mesurada, (per exemple, absortivitats) poden obtenir-se de forma lineal un cop determinats els anteriors. Per exemple, en un sistema de fotodegradació, en què el procés se segueix adquirint una sèrie de 60 a 120 longituds d'ona i en què el compost parental es degrada seguint l'esquema de reacció $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$, el nombre total de paràmetres a determinar és de 362. Aquest nombre de paràmetres és la suma de les 360 absortivitats molars (3 espècies (A, B, C) \times 120 longituds d'ona), que determinen els espectres de la matriu \mathbf{S}^T , i de les dues constants de fotodegradació, k_1 i k_2 , que descriuen la forma dels perfils cinètics (**C**). Les absortivitats molars són paràmetres lineals i les constants de fotodegradació són paràmetres no lineals. Aquest elevat nombre de paràmetres pot quedar

substancialment reduït tenint en compte que aquest dos tipus de paràmetres influeixen de manera independent sobre els termes de l'equació bilineal ($\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}$), i per tant, es poden separar linealment [Maeder, 1990]. D'aquesta manera, es calculen els paràmetres de la reacció química a partir d'un procés iteratiu no lineal i, després, els paràmetres espectrals a partir d'una equació lineal explícita.

El càlcul dels paràmetres no lineals del procés parteix del fet que la matriu de residuals \mathbf{E} del model bilineal $\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T$ es pot escriure com segueix:

$$\mathbf{E} = \mathbf{D} - \mathbf{CS}^T = \mathbf{D} - \mathbf{CC}^+ \mathbf{D} = \mathbf{D}(\mathbf{I} - \mathbf{CC}^+) \quad \text{Equació 4.4}$$

on es pot observar que el càlcul de la matriu de residuals depèn únicament de la matriu de concentracions \mathbf{C} , és a dir, únicament dels valors dels paràmetres no lineals que defineixen els perfils que la componen i que cal optimitzar [Maeder, 1990]. Així, el primer pas consisteix en obtenir els paràmetres no lineals del procés (constants de fotodegradació) que minimitzen els residuals definits en l'equació 4.4.

Un cop estimats aquests paràmetres no lineals i, per tant, la matriu \mathbf{C} , es pot calcular la matriu de perfils espectrals \mathbf{S}^T per mínims quadrats lineals a partir de la següent equació:

$$\mathbf{S}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{D} \quad \text{Equació 4.5}$$

on \mathbf{C}^+ és la matriu pseudoinversa de \mathbf{C} que ve definida per la següent equació:

$$\mathbf{C}^+ = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \quad \text{Equació 4.6}$$

4.3 1.3. OPTIMITZACIÓ DELS PARÀMETRES NO LINEALS

L'optimització consisteix en la determinació dels valors dels paràmetres d'un determinat model que fan que la suma dels quadrats dels residuals associats a la descripció de les dades experimentals sigui mínima [Golub, 1996; Gans, 1976].

Els residuals es defineixen com la diferència entre la mesura experimental (d_i) i el seu valor calculat a partir del model ($d_{\text{calc } i}$) tal com s'indica en l'equació 4.7.

$$e_i = d_i - d_{\text{calc } i} \quad \text{Equació 4.7}$$

La funció a minimitzar per tal d'avaluar la qualitat de l'ajust obtingut és la suma de quadrats dels residuals (ssq) que es defineix en la següent equació.

$$ssq = \sum_i e_i^2 = \sum_i (d_i - d_{\text{calc } i})^2 \quad \text{Equació 4.8}$$

Hi ha diferents mètodes d'optimització de paràmetres no lineals [Gans, 1992; Saeber, 1989]. Els més destacats són els basats en el mètode Newton-Gauss-Levenberg/Marquardt (NGL/M) [Maeder, 2007; Bevington, 2002] i en el mètode Simplex [Long, 1969]. El mètode Simplex és conceptualment més simple però el mètode NGL/M sol ser el més ràpid, ofereix estimacions directes dels errors associats als paràmetres ajustats i és el que s'ha fet servir

en aquesta tesi. A continuació es farà una explicació detallada del mètode NGL/M.

Mètode Newton-Gauss-Levenberg/Marquardt (NGL/M)

És un procés d'optimització iteratiu i, per tant s'inicia amb unes estimacions inicials dels paràmetres, k_0 . A cada iteració, es milloren aquests paràmetres a partir del càlcul del vector de canvi dels paràmetres, Δk , el qual es determina mitjançant les derivades dels residuals respecte als paràmetres [Maeder, 1990].

La matriu dels residuals (E) un cop aplicat el vector Δk es pot aproximar a una expressió de Taylor de primer ordre.

$$E(k_0 + \Delta k) \cong E(k_0) + \Delta k \frac{dE(k_0)}{dk} \quad \text{Equació 4.9}$$

on la derivada $dE(k_0)/dk$ s'anomena Jacobià (J). Per tal de minimitzar el residual $E(k_0 + \Delta k)$ la seva aproximació s'igual a zero.

$$E(k_0 + \Delta k) \cong E(k_0) + \Delta k J \approx 0 \quad \text{Equació 4.10}$$

i permet, d'aquesta manera calcular el vector Δk

$$\Delta k = -J^+ E(k_0) \quad \text{Equació 4.11}$$

on J^+ és la pseudoinversa de J i ve definida per la següent equació:

$$J^+ = (J^T J)^{-1} J^T \quad \text{Equació 4.12}$$

A cada iteració, en general, Δk i ssq disminueixen. Sovint, el canvi relatiu de ssq , en iteracions consecutives, s'utilitza com a criteri de convergència. Per tal d'evitar optimitzacions divergents s'afegeix als elements de la diagonal de la matriu quadrada $J^T J$ un valor escalar mp , conegut com el paràmetre Marquardt [Marquardt, 1963]. Aquest paràmetre modifica el vector Δk fent-lo més gran quan l'optimització divergeix i més petit quan la direcció d'optimització és la correcta. Amb aquest procediment, la cerca del valor dels paràmetres és més robusta i més ràpida. El següent esquema resumeix el funcionament del mètode NGL/M:

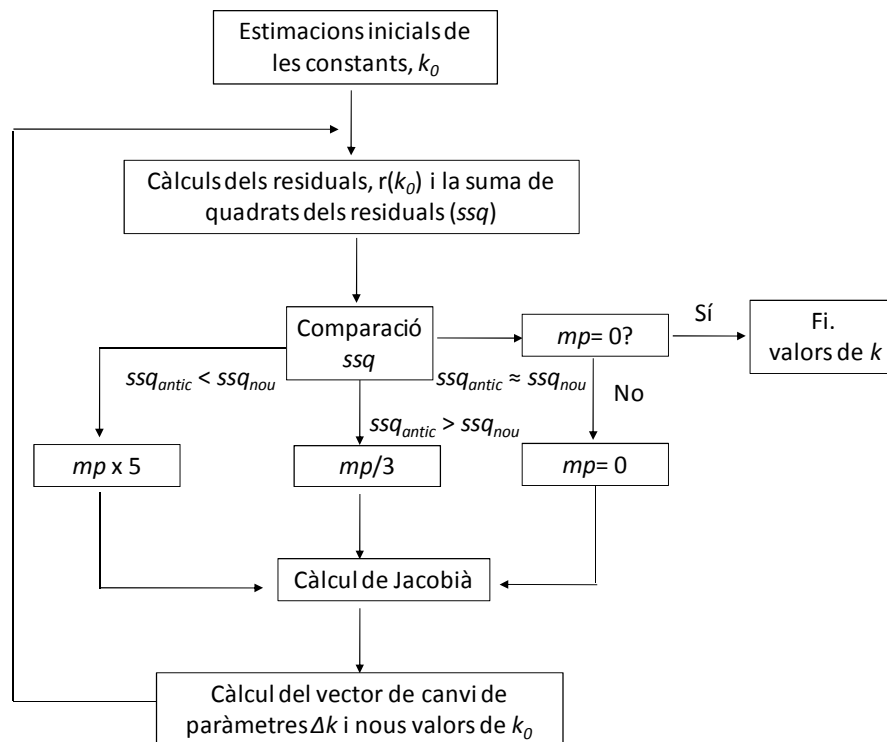


Figura 4.6. Esquema del procediment de l'algoritme NGL/M.

Aquets procés permet, a més, obtenir l'estimació de l'error associat als paràmetres ajustats [Benvington, 2002]. La desviació estàndard, σ_{ki} dels k_i paràmetres és el producte de la desviació estàndard dels residuals, σ_d , i l'arrel quadrada de l'element i-éssim h_{ii} de la diagonal de la matriu invertida $(J^T J)^{-1}$, anomenada matriu Hessiana:

$$\sigma_{ki} = \sigma_d \sqrt{h_{ii}} \quad \text{Equació 4.13}$$

La desviació estàndard dels residuals és l'arrel quadrada de la **ssq** dividit pels graus de llibertat (n), que es defineixen com el nombre total de valors experimentals menys els nombre de paràmetres que s'han d'ajustar (lineals i no lineals).

$$\sigma_d = \frac{\sqrt{h_{ii}}}{n} \quad \text{Equació 4.14}$$

Els graus de llibertat es determinen com el nombre total de mesures menys el nombre de paràmetres que es determinen. En cas del sistema de degradació anteriorment esmentat, en què l'evolució del procés se segueix adquirint 60 espectres a 120 longituds d'ona cadascun i en què el compost parental es degrada seguint l'esquema de reacció $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$, els graus de llibertat són 6568 (60 espectres adquirits x 120 longituds d'ona – 362 paràmetres determinats).

4.3.1.4. ANÀLISI SIMULTÀNIA DE DIFERENTS EXPERIMENTS

Tal com s'ha comentat anteriorment, un cop estimada la matriu \mathbf{C} es pot calcular per mínims quadrats la matriu de perfils espectrals \mathbf{S}^T a partir de l'equació lineal 4.6 ($\mathbf{S}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{D}$) on \mathbf{C}^+ és la matriu pseudoinversa de \mathbf{C} . Per poder calcular la matriu pseudoinversa de \mathbf{C} , i en conseqüència determinar els perfils espectrals associats, la matriu \mathbf{C} ha de ser de rang complet, és a dir, els perfils de concentració de les espècies que participen en el sistema han de ser linealment independents. Però freqüentment, en els estudis de processos químics, els perfils de concentració són linealment dependents, com és el cas del sistema cinètic $A + B \xrightarrow{k_1} C$ en què el rang de la matriu \mathbf{C} és 2 i el sistema complet de tres components no es pot resoldre (problema de deficiència de rang, vegeu apartat 4.4.2.4.2). També hi ha experiments en què les espècies es troben en molt baixa concentració i, per tant, la qualitat dels paràmetres espectrals corresponents que es determinen pot ser baixa. Així, per a l'estudi de processos químics, moltes vegades no és possible dissenyar un únic experiment que proporcioni informació suficientment fiable i robusta sobre tots els aspectes del sistema.

En aquests casos, una bona estratègia és realitzar l'anàlisi simultània de diferents experiments, realitzats en condicions diferents, de tal manera que es trenqui la deficiència de rang observada en l'experiment individual i es millorin les estimacions espectrals. Els mètodes de modelització rígida permeten l'anàlisi simultània de diferents experiments [Dyson, 1997; Bugnon, 1994]. Aquesta anàlisi simultània s'aconsegueix a partir de la construcció d'una matriu \mathbf{D} augmentada (\mathbf{D}_{aug}) on diverses matrius (\mathbf{D}_i) s'encadenen una sota l'altra. D'aquesta manera diversos experiments s'ajusten simultàniament

a un únic model químic global. Com a resultat, s'obté un únic valor global dels paràmetres a determinar, per a tot el conjunt de dades i per tant, la robustesa dels resultats millora considerablement. L'anàlisi simultània de diversos experiments es pot a dur a terme de dues maneres diferents, tal com es mostra en la figura següent:

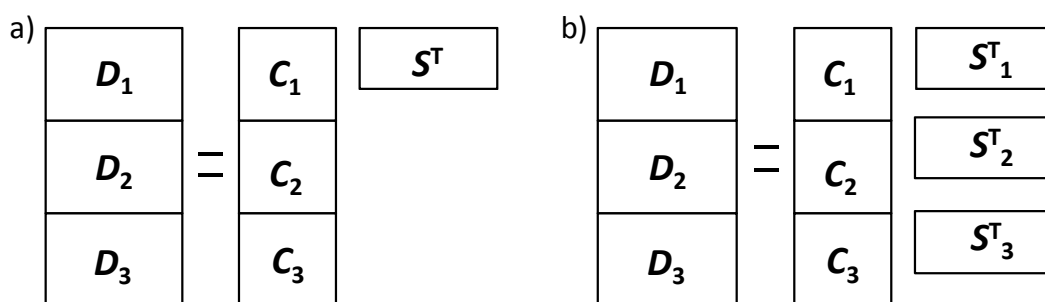


Figura 4.7. Representació esquemàtica de l'anàlisi simultani de diversos experiments amb metodologies de modelització rígida. (a) Representa l'anàlisi global total i (b) representa l'anàlisi global parcial.

La Figura 4.7-a representa una anàlisi global total, en què a partir dels valors globals dels paràmetres ajustats, s'obtenen diferents matrius de concentració corresponents a cada experiment, però una única matriu d'espectres. La figura 4.7-b representa un anàlisi global parcial, en què les matrius de concentracions procedeixen d'un model global, però per a cada experiment s'obté una matriu d'espectres diferents. Aquesta darrera estratègia és útil en situacions en què els diferents experiments comportin un canvi espectral de les espècies que participen en el sistema.

Tal com s'ha comentat, els diversos experiments s'ajusten simultàniament a un únic model químic global. Per tant, l'anàlisi simultània només es podrà dur a terme quan les dades presentin el mateix model cinètic. Si presenten models

cinètics diferents, aquests models hauran d'estar relacionats matemàticament entre ells (per exemple mitjançant l'equació d'Arrhenius, que relaciona la dependència de les constants cinètiques amb la temperatura). En cas que no existeixi cap relació entre aquests models, l'anàlisi simultània no es podrà dur a terme.

4.3.1.5. LIMITACIONS DELS MÈTODES DE MODELITZACIÓ RÍGIDA

Tot i que aquests tipus de mètodes poden proporcionar unes solucions veritables i molt robustes, també presenten una sèrie de limitacions que cal siguin considerades:

Elecció del model químic

L'elecció del model químic és, sense dubte, l'aspecte més difícil dels mètodes de modelització rígida. Per a aquests mètodes és necessari postular un model químic que descrigui de forma acurada el sistema estudiat. La postulació del model químic és, freqüentment, molt complexa, ja que hi pot haver involucrats simultàniament diversos processos i es requereix un bon coneixement previ del sistema. Si aquest coneixement no és disponible, s'hauran de dur a terme diversos assajos per tal de determinar quin és el model més satisfactori. S'han de provar tots els models possibles que tinguin sentit d'acord amb la química del sistema, sempre començant pels més simples i seguint pels més complexos fins a arribar a trobar aquell que presenti un ajust òptim de les dades, és a dir, que la suma dels quadrats dels residuals (ssq) sigui mínima i una complexitat acceptable. Per a prendre la decisió de

quin és el model més correcte, també s'acostuma a tenir en compte els errors associats a la determinació dels paràmetres. A més, el model finalment escollit ha de presentar solucions amb significat químic. Per exemple, els espectres associats han de tenir certes propietats (com la no-negativitat) i formes coherents amb les dades experimentals i el tipus de problema estudiat. En casos en què no es té un coneixement previ del sistema químic, els mètodes de modelització flexible seran una possible alternativa molt útil per tal d'ajudar a postular un model raonable, com veurem més endavant. També s'han fet propostes de cerca exhaustiva d'un determinat model mitjançant l'ús d'eines quimiomètriques, com els algoritmes genètics [Maeder,2004]. De totes maneres, no existeix una solució general per a aquest problema.

Ambigüitats

Tot i que en postular un model, l'ajust a les dades experimentals sol proporcionar una solució única, existeixen alguns mecanismes en què s'ajusta més d'un paràmetre on hi pot haver una certa ambigüitat. És el cas de les reaccions consecutives de primer ordre $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ en què intercanviar els valors de k_1 i k_2 proporciona el mateix ajust de les dades experimentals [Andraos, 1999].

Estimacions inicials

Unes bones estimacions inicials dels paràmetres a optimitzar són indispensables per a garantir l'èxit dels mètodes d'optimització no lineal. Si les estimacions escollides són properes al mínim global de la corresponent superfície de resposta, l'etapa d'optimització podrà convergir cap a la solució òptima. Si l'etapa d'optimització divergeix s'hauran de canviar les estimacions inicials.

També es pot donar el cas que l'optimització convergeixi cap a una solució no òptima (mínim locals).

Limitacions associades al senyal mesurat i als experiments realitzats

La limitació més important i insalvable en els mètodes de modelització rígida és la possible presència d'interferents desconeguts en el senyal espectroscòpic mesurat. Tal com s'esmentava en l'equació 4.8, l'equació minimitzada en els mètodes de modelització rígida és ($ssq = \mathbf{D}(\mathbf{I} - \mathbf{C}\mathbf{C}^+)$) on només apareix el senyal mesurat (\mathbf{D}) i la matriu dels perfils de concentració definida pel model (\mathbf{C}). La conseqüència és que tot el senyal mesurat ha de respondre al model postulat. En cas de presència d'interferents, els resultats que s'obtingran seran incorrectes, ja que aquestes espècies també contribueixen al senyal, però la seva variació no queda definida pel model cinètic.

L'altra problemàtica pròpia del funcionament d'aquests mètodes és la limitació pel que fa al tipus d'experiments que poden tractar-se conjuntament. Tots ells han de respondre a un mateix model global o a models individuals interconnectats entre ells. L'anàlisi simultània d'experiments que comparteixin espècies químiques, però que tinguin models de variació independents, no és viable.

Per tal de superar aquestes dificultats es poden utilitzar els mètodes de modelització flexible i els mètodes de modelització híbrida que s'expliquen en els següents apartats.

4.3.2. MÈTODES DE MODELITZACIÓ FLEXIBLE

Tal com s'ha dit anteriorment, aquests mètodes no fan servir cap model químic explícit en el càlcul dels perfils de concentració del procés, sinó que simplement descomponen la matriu de dades experimentals \mathbf{D} en el producte de la matriu de perfils de concentració \mathbf{C} i de la matriu d'espectres purs \mathbf{S}^T mitjançant l'aplicació de restriccions que responen a propietats generals dels perfils de concentració o de resposta del sistema químic en estudi. La utilització de característiques dels perfils del sistema, com poden ser la no-negativitat, la unimodalitat o la selectivitat espectrals o les de concentració en el càlcul de les matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T proporciona una bona descripció de la variació de les dades mesurades mitjançant perfils de concentració i de resposta amb significat químic [de Juan, 2000a, 2006, 2009; Jaumot 2005; Tauler, 1995a, 1995b].

En els últims anys s'han desenvolupat diferents mètodes de modelització flexible, entre els quals s'inclou el mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (*multivariate curve resolution-alternating least squares*, MCR-ALS) [de Juan, 2000a, 2006, 2009], [Tauler, 1995a, 1995b], mètode amb el qual s'han tractat les dades d'aquesta tesi. L'ús de l'algoritme MCR-ALS implica el seguiment de les etapes descrites a continuació:

1. Determinació del nombre de components presents en el senyal mesurat (\mathbf{D}).
2. Creació d'estimacions inicials dels perfils de concentració (\mathbf{C}) o dels perfils espectrals (\mathbf{S}^T).

3. Estimació de les matrius C i S^T mitjançant l'aplicació d'un procés d'optimització iteratiu de mínims quadrats alternats sota restriccions (*alternating least squares*, ALS) fins que s'arriba a la convergència.

A continuació, es fa una descripció detallada de cadascuna d'aquestes etapes.

4.3.2.1. DETERMINACIÓ DEL NOMBRE DE COMPONENTS QUÍMICS PRESENTS EN EL SISTEMA

El primer pas en qualsevol mètode de resolució és la determinació del nombre de contribucions independents necessari per a descriure la variació observada en la matriu de dades experimentals D (en les dades de la present memòria, aquest nombre està associat sovint espècies químiques presents en la fotodegradació). Es pot tenir un coneixement previ del sistema, que indiqui el nombre de components possible del sistema en estudi. En cas de no tenir aquesta informació s'ha de recórrer a l'ús de mètodes quimiomètrics que analitzi la variació de les dades experimentals [Malinowski, 1991]. En aquesta tesi s'ha utilitzat l'anàlisi per components principals (de l'anglès, *principal component analysis*, PCA) amb aquest objectiu.

El mètode PCA és una tècnica d'anàlisi multivariant que permet reduir la complexitat de les matrius de dades experimentals i conèixer la seva estructura interna. L'aplicació de l'anàlisi per components principals permet obtenir un model bilineal abstracte que explica la variació experimental observada en la matriu D utilitzant el mínim nombre de components (factors) possible [Malinowski, 1991].

L'anàlisi per components principals descomposa matemàticament la matriu de dades experimentals \mathbf{D} en el producte de dues matrius \mathbf{T} i \mathbf{P}^T :

$$\mathbf{D} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T \quad \text{Equació 4.15}$$

on \mathbf{T} és la matriu de *scores* i \mathbf{P}^T és la matriu de *loadings*. Aquesta descomposició matemàtica es realitza sota restriccions de màxima variància explicada i ortogonalitat. A la pràctica, aquesta descomposició es troba a partir del càlcul de vectors i valors propis de la matriu de covariància de \mathbf{D} . En l'anàlisi per components principals, els factors s'ordenen en ordre descendent en funció de la variància que són capaços d'explicar. Per tant, el primer component (que es representa pel primer factor) està associat amb el valor propi més gran i explica el percentatge més gran de variància. El segon component explica el percentatge de variància romanent més gran no descrita pel primer component i, així successivament.

Per a l'anàlisi per components principals s'ha fet servir l'algoritme de descomposició en valors singulars (de l'anglès, *singular value decomposition*, SVD [Golub, 1970]). Segons SVD, la matriu de dades es descompon en:

$$\mathbf{D}_{(m,n)} = \mathbf{U}_{(m,nc)} \mathbf{S}_{(nc,nc)} \mathbf{V}_{(nc,n)}^T \quad \text{Equació 4.16}$$

on \mathbf{U} , i \mathbf{V}^T són les matrius de *scores* i *loadings* normalitzats en l'equació 4.16, respectivament, i \mathbf{S} és una matriu els elements de la diagonal de la qual són els valors singulars de cada component. Els valors singulars són l'arrel quadrada dels valors propis.

La magnitud dels valors singulars relacionats amb causes químiques de variació experimental sol ser clarament superior a la dels valors singulars que només expliquen el soroll experimental de la mesura. La distinció entre uns i altres, és a dir, entre els components amb significat químic i els components corresponents a soroll experimental, pot ser en alguns casos difícil, sobretot si existeixen contribucions sistemàtiques a l'error experimental. De tota manera, la representació gràfica dels valors singulars és una manera fàcil i intuïtiva per a tenir una primera aproximació del nombre de components necessaris per a explicar la variació química de la matriu \mathbf{D} .

La Figura 4.8 mostra una representació gràfica dels valors singulars (matriu \mathbf{S}) procedents d'un experiment de fotodegradació. Tal com s'observa, es veu un descens de magnitud a partir del quart valor singular. Tots els valor singulars posteriors són petits i similars. Per tant, aquest sistema podria ser descrit per quatre contribucions químiques.

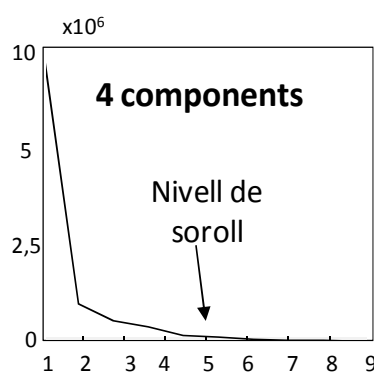


Figura 4.8. Gràfic de descomposició de valors singulars per a una matriu corresponent a un seguiment cinètic de fotodegradació.

El nombre de components determinat per SVD té, en molts casos, un valor orientatiu. Per això és comú realitzar l'anàlisi per MCR-ALS utilitzant diferents nombres de components. La solució final serà aquella que

proporcioni un millor ajust de les dades i proporcioni perfils de concentració i espectres resolts químicament interpretables.

4.3.2.2. DETERMINACIÓ DE LES ESTIMACIONS INICIALS.

Un cop es coneix el nombre de components o factors que es poden relacionar amb el nombre d'espècies químiques que es troben en el sistema, el pas següent consisteix en buscar estimacions inicials dels perfils de concentració (perfils cinètics o d'elució) o dels espectres purs, que posteriorment seran optimitzades mitjançant l'aplicació del procés iteratiu de mínims quadrats alternats (ALS) sota restriccions.

En la generació d'aquestes estimacions inicials es pot partir de perfils de concentració o perfils d'espectres prèviament coneguts, en el cas de tenir informació química prèvia. Si no es disposa d'aquesta informació, existeixen diferents mètodes quimiomètrics per a la selecció dels espectres o dels perfils de concentració més representatius de la matriu \mathbf{D} . En la present memòria, la generació d'aquestes estimacions s'obté a partir de l'anàlisi de factors emergents (de l'anglès *Evolving Factor Analysis*, EFA) en el cas d'estimacions inicials de \mathbf{C} o a partir de procediments de detecció de les variables més pures en el cas d'estimacions de la matriu \mathbf{S}^T .

Anàlisi de factors emergents (*Evolving Factor Analysis*, EFA)

El mètode EFA utilitza la informació sobre la natura evolutiva pròpia dels perfils de concentració d'un procés químic i es pot, per tant, aplicar a qualsevol sistema químic en evolució (reaccions, elucions cromatogràfiques,...). La idea fonamental del mètode EFA és estudiar el canvi en la magnitud dels valors propis o singulars de la matriu de dades en funció

de l'evolució del procés. Primer s'analitza el procés d'inici a fi (EFA creixent, *Forward* EFA) per tal de detectar l'aparició de nous components en el procés i després en sentit contrari, de fi a principi (EFA decreixent, *backward* EFA) per tal d'obtenir la informació complementària; és a dir, la desaparició dels components del procés. En *forward* EFA, es comença fent l'anàlisi de components principals de les dues primeres files de la matriu i trobant els valors propis corresponents. Després es fa el mateix, afegint cada cop una fila més a la submatriu analitzada, fins que s'arriba a l'anàlisi de la matriu total. L'aparició de cada nou component químic en el procés estarà associada a l'increment en un component del rang (vegeu Figura 4.9-a). Per al *backward* EFA, el mateix procés es repeteix en direcció contrària (partint de l'última fila de la matriu de dades fins arribar a l'inici, vegeu Figura 4.9-b). En el diagrama, els valors propis obtinguts per al primer component principal de cada submatriu s'uneixen amb una línia, amb l'objectiu d'analitzar correctament la seva evolució, després tots els del segon valor propi, i així successivament.

Així doncs, la combinació dels resultats procedents de l'EFA creixent i de l'EFA decreixent en un únic diagrama EFA proporciona informació sobre el nombre total d'espècies, l'evolució del procés (on apareixen i desapareixen els components), i l'interval d'existència de cada espècie. Si s'uneixen les línies dels valors propis associats a les aparicions de les espècies amb les corresponents línies associades a la seva desaparició, es poden obtenir estimacions inicials dels perfils de concentració. En l'ús d'EFA per a la construcció d'estimacions inicials, cal dir que s'assumeix que el procés té una evolució seqüencial, es a dir, la primera espècie que apareix és la primera en desaparèixer i així, successivament.

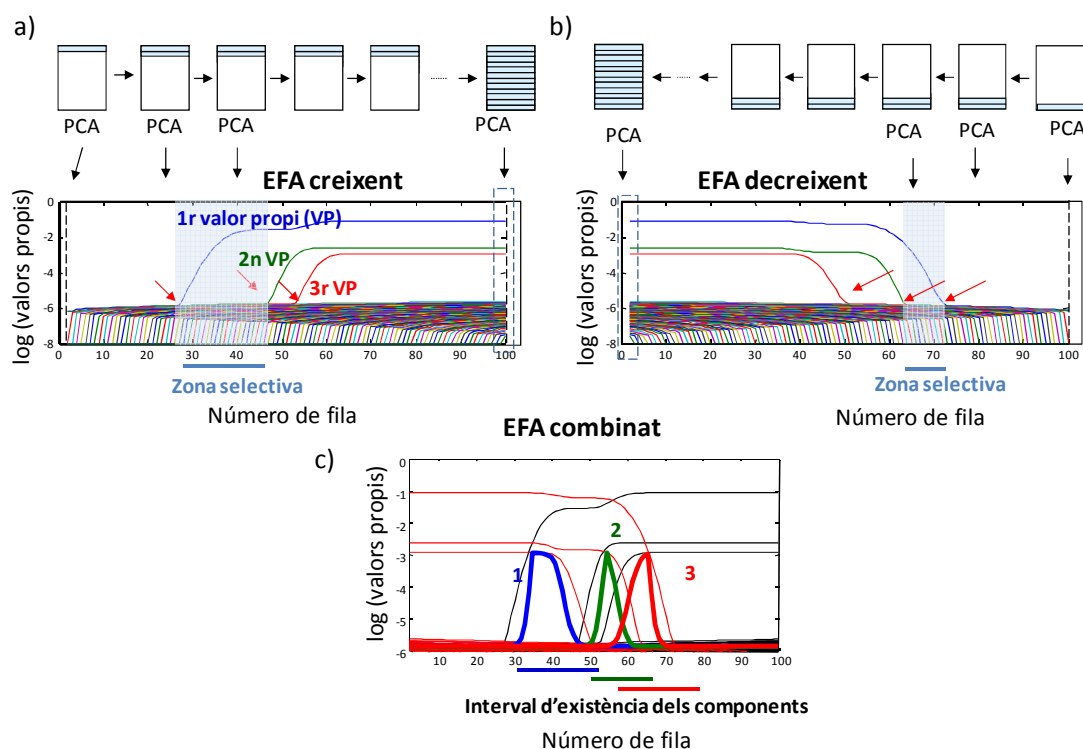


Figura 4.9. Representació esquemàtica del mètode EFA. (a) Diagrama format a partir de l'anàlisi EFA creixent, (b) diagrama format a partir de l'anàlisi EFA decreixent, (c) diagrama EFA combinat (en traç gruixut, estimacions dels perfils de concentració).

EFA és especialment adequat per a sistemes seqüencials evolutius, com són els sistemes cromatogràfics i els sistemes cinètics simples. Tanmateix, en l'anàlisi de processos complexos, en què la condició de seqüencialitat no és aplicable, l'ús de mètodes de detecció de variables més pures és l'alternativa que cal utilitzar.

Mètodes de detecció de les variables més pures.

L'algoritme que s'ha fet servir per determinar les variables més pures està basat en el mètode SIMPLISIMA (*Simple-To-Use Interactive Self Modelling Analysis*) [Windig, 1991, 1993]. Aquest mètode permet trobar les variables

més pures en un conjunt de dades experimentals (\mathbf{D}) sense la necessitat de realitzar l'anàlisi de components principals, ja que es basa en seleccionar les files (espectres) o columnes (perfils de concentració) més diferents entre elles de la matriu de dades \mathbf{D} (vegeu Figura 4.10), d'acord amb un criteri predeterminat de mesura de la puresa.

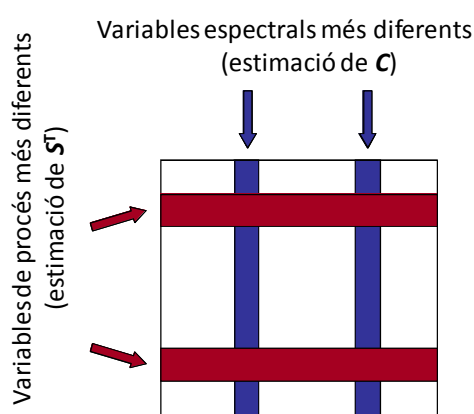


Figura 4.10. Representació gràfica de l'obtenció de perfils de concentració (\mathbf{C}) o espectres (\mathbf{S}^T) segons el mètode SIMPLISMA.

Cada fila o columna de la matriu de dades \mathbf{D} està formada per les contribucions d'un o més components. La puresa d'una variable i , (p_i) relativa a una fila o una columna queda definida per la seva desviació estàndard relativa que es pot calcular segons la següent equació:

$$p_i = \frac{s_i}{m_i} \quad \text{per } i = 1, \dots, m \text{ files o columnes} \quad \text{Equació 4.17}$$

on p_i és la desviació estàndard relativa, s_i la desviació estàndard i m_i la mitjana per a una determinada fila o per a una determinada columna i . Una desviació estàndard relativa gran indica una puresa alta per a aquesta fila o columna. Per tal d'evitar la sobrevaloració de files o columnes amb un valor mitjà petit, que

presentarien una puresa elevada (generalment les variables que contenen molt soroll) s'introdueix un factor de correcció f (que varia segons el nivell de soroll present en les dades experimentals). D'aquesta manera, l'equació 4.17 es reescriu com:

$$p_i = \frac{s_i}{m_i + f} \quad \text{Equació 4.18}$$

i les variables de soroll no són seleccionades.

El procediment comença trobant la fila o columna amb la major desviació estàndard relativa (màxima puresa) definida com en l'equació 4.18. Seguidament, es procedeix a la normalització d'aquesta fila o columna i es busca la segona variable de major puresa. Aquesta variable a més de posseir la major desviació estàndard relativa possible, haurà de presentar la mínima correlació amb la primera variable pura trobada. Per tant, es calcula un factor de ponderació, w_i , de la següent manera:

$$w_i = \det(\mathbf{Y}_i^T \mathbf{Y}_i) \quad \text{per } i = 1, \dots, m \text{ files o columnes} \quad \text{Equació 4.19}$$

on \mathbf{Y}_i^T és la matriu formada per les files o columnes de les variables pures trobades fins aleshores, més la fila o columna normalitzada de la variable i de la matriu de dades, que encara no ha estat seleccionada. El valor calculat pel determinant ens indicarà el grau d'independència que existeix entre les variables pures prèviament trobades i la fila o columna i escollida per a construir la matriu \mathbf{Y}_i^T . Així, el determinant tindrà un valor més alt quan les variables escollides no estiguin correlacionades amb la variable i , mentre que donarà un valor menor si la informació de la variable i s'assembla a la de les variables triades.

Així, per a les següents variables a analitzar, s'aplica el factor de ponderació de manera que l'expressió de la puresa (p_i') canvia lleugerament:

$$p_i' = w_i \left(\frac{s_i}{m_i + f_i} \right) \quad \text{Equació 4.20}$$

i la variable de puresa continua considerant la desviació estàndard relativa de la variable, ara sospesada per un valor que reflecteix la seva diferència respecte a les variables prèviament seleccionades. Per a la selecció de cada nova variable, es recalcula el pes w_i i la puresa segons l'equació 4.20.

En el present treball, el mètode de detecció de variables més pures ha permès obtenir estimacions inicials dels espectres dels compostos presents en el sistema sense necessitat que les dades analitzades compleixin la condició de seqüencialitat demanada pel mètode EFA.

En la Figura 4.11, es mostra l'aplicació del mètode SIMPLISMA a una matriu de dades cromatogràfiques. En aquest cas, es pot observar que la primera variable més pura que el mètode selecciona correspon a l'espectre número 52 (vegeu Figura 4.11-a). La segona variable més pura i més diferent de la primera correspon a l'espectre número 39 (vegeu Figura 4.11-b) i la tercera variable més pura correspon a l'espectre número 64 (vegeu Figura 4.11-c). En canvi, la quarta variable més pura no presenta cap màxim en la representació de la puresa de cada fila i té una variació que recorda el soroll de fons (vegeu Figura 4-11-d). Quan això succeeix, es dona per acabada la selecció de variables. D'aquesta manera, el mètode SIMPLISMA també serveix indirectament per a determinar el nombre de components químics del sistema. La Figura 4.11-e mostra els tres espectres seleccionats pel mètode SIMPLISMA.

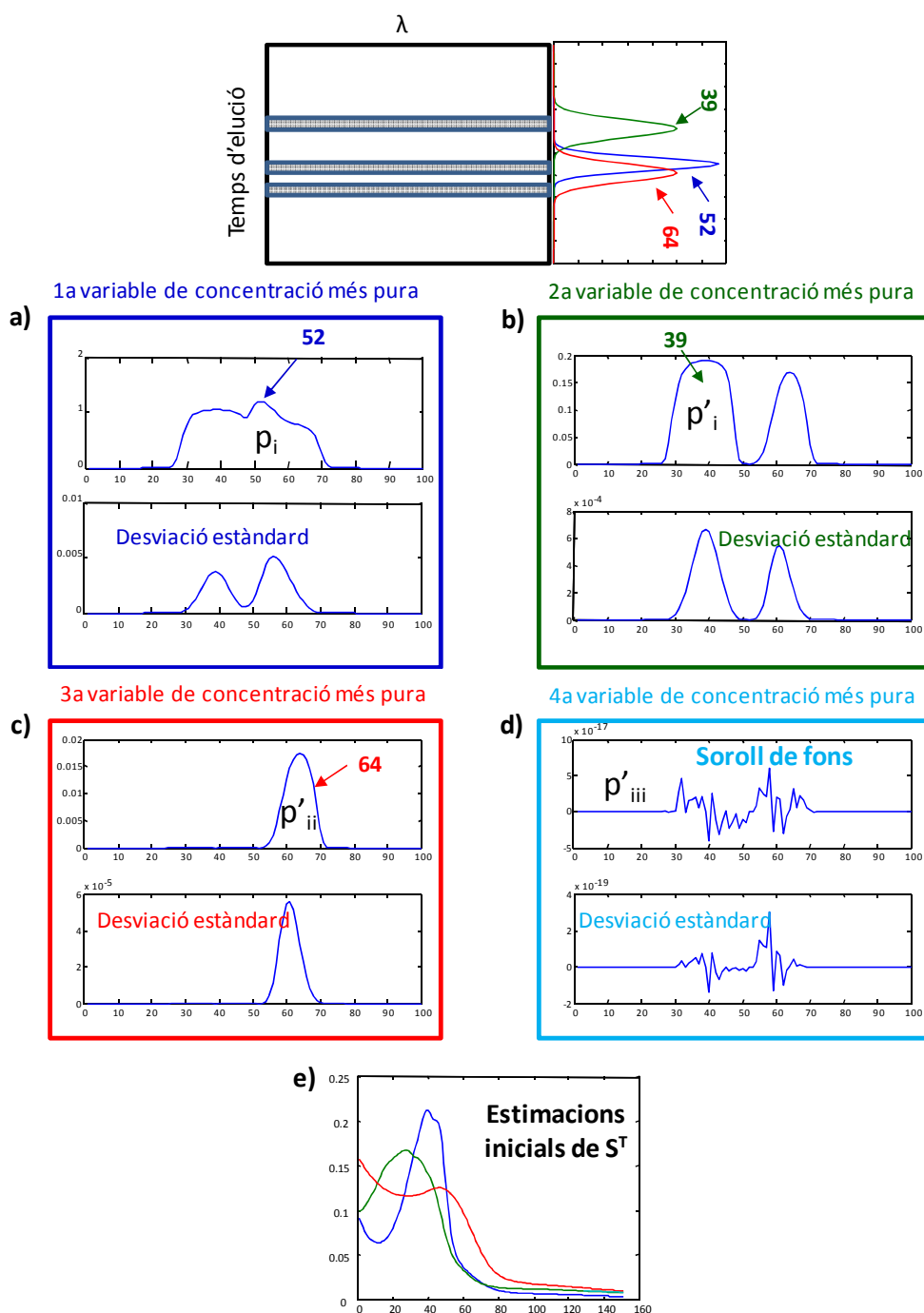


Figura 4.11. Representació esquemàtica del mètode SIMPLISMA. (a) La primera variable més pura de la matriu de dades \mathbf{D} (b) La segona variable més pura i més diferent de la primera, (c) La tercera variable més pura i més diferent de la primera i a la segona (d) Quarta variable més pura, que ens indica que el nombre de components de la matriu és tres (e) Representació dels espectres escollits com els més purs.

4.3.2.3. OPTIMITZACIÓ ITERATIVA DELS PERFILS DE CONCENTRACIÓ I DELS ESPECTRES PURS

Finalment el tercer pas en el procés de resolució consisteix a realitzar específicament el procés de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats. Un cop conegudes les estimacions inicials dels perfils de concentració (a partir de EFA) o dels perfils espectrals (a partir de SIMPLISMA), s'optimitzen mitjançant l'algoritme de mínims quadrats alternats (ALS) sota restriccions [de Juan, 2000a, 2006,2009; Jaumot 2005; Tauler, 1995a, 1995b], amb la qual cosa s'obtenen perfils de concentració i espectres amb sentit químic i que proporcionen informació útil i interpretable sobre el sistema analitzat.

A cada iteració de l'optimització s'obté una nova estimació de la matriu d'espectres \mathbf{S}^T i de perfils de concentració \mathbf{C} utilitzant les dues equacions següents:

$$\mathbf{C} = \mathbf{D} \mathbf{S}^{T+} \quad \text{Equació 4.21}$$

$$\mathbf{S}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{D} \quad \text{Equació 4.22}$$

on \mathbf{S}^{T+} i \mathbf{C}^+ són les matrius pseudoinverses de \mathbf{S}^T i \mathbf{C} , respectivament [Golub, 1996]. L'equació 4.21 parteix d'estimacions inicials de \mathbf{S}^T . Si el procés iteratiu s'inicia amb estimacions de \mathbf{C} , l'ordre de les equacions 4.21 i 4.22 és l'invers. A continuació, es recalcula la matriu de dades reproduïda a partir del producte dels perfils de concentració i dels perfils espectrals resolts. Si la matriu de dades calculada per MCR-ALS (\mathbf{D}_{calc}) és suficientment semblant a la matriu de dades experimentals (\mathbf{D}) es finalitza el procés iteratiu i s'accepten les matrius

\mathbf{C} i \mathbf{S}^T com a resultat final. En cas contrari s'inicia un nou cicle iteratiu. El procés iteratiu es dona per finalitzat quan es compleix el criteri de convergència que s'ha establert a l'inici de l'optimització o quan s'ha arribat a un nombre preseleccionat d'iteracions. La convergència es defineix en termes de canvi relatiu de la desviació estàndard dels residuals entre dos cicles consecutius. Generalment, el procediment descrit és ràpid i s'assoleix la convergència (sovint definida per un canvi relatiu de menys del 0.1 % en l'ajust d'iteracions consecutives) en menys de 50 cicles d'optimització.

Els paràmetres que s'utilitzen per a valorar la qualitat de l'ajust del model són els següents:

- a) La manca d'ajust de les dades experimentals a partir de la reproducció del model bilineal (de l'anglès *% lack of fit*, %LOF), que s'estima a partir de l'equació:

$$\%LOF = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad \text{Equació 4.23}$$

on d_{ij} és l'element de la matriu de dades originals de la fila i i la columna j , i d_{ij}^* és l'element reproduït amb les solucions obtingudes amb MCR-ALS a la mateixa fila i i columna j . Idealment, la manca d'ajust ha de tenir un valor similar al soroll de fons o error experimental.

- b) El percentatge de variància explicada (R^2), que es calcula d'acord amb l'equació següent:

$$R^2 = 100 \times \left(\frac{\sum_{ij} d_{ij}^2 - \sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \right) \quad \text{Equació 4.24}$$

Com ja s'ha dit anteriorment, en l'optimització dels perfils de concentració i dels espectres per mínims quadrats alternats (ALS) s'apliquen una sèrie de restriccions a les solucions matemàtiques obtingudes per tal d'aconseguir perfils de concentració o de resposta que tinguin ple significat químic [Tauler, 1997]. A continuació, es farà una breu descripció de les possibles restriccions que es poden aplicar durant el procés optimització d'ALS.

No-negativitat (Figura 4.12): Aquesta és la restricció més general en l'optimització per mínims quadrats. Les concentracions dels components químics han d'ésser sempre valors positius o zero; per tant, s'aplica a tots els perfils de concentració (químicament no té sentit que existeixi una concentració negativa). També es pot aplicar a respostes instrumentals que proporcionen sempre valors de senyal positius (per exemple, espectroscòpia d'absorció molecular o espectrometria de masses). Aquesta restricció es pot dur a terme utilitzant algoritmes de mínims quadrats no negatius [Lawson, 1974] o simplement forçant les solucions de les equacions 4.21 i 4.22 tenir un valor de zero o un de positiu molt petit.

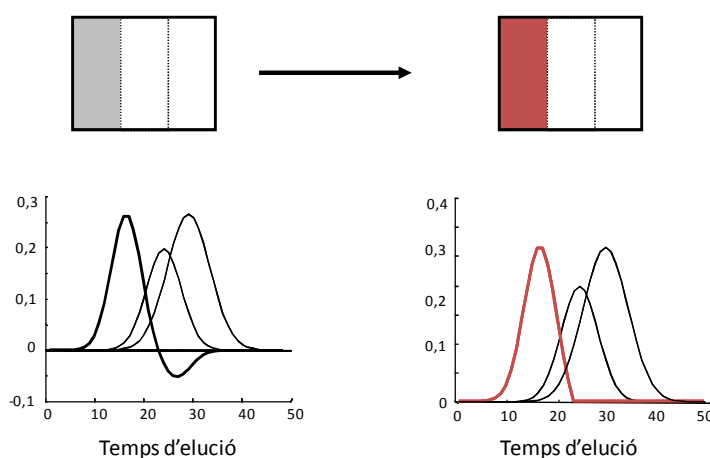


Figura 4.12. Representació gràfica de l'aplicació de restricció de no-negativitat.

Unimodalitat (Figura 4.13): Aquesta restricció s'aplica a perfils que només han de presentar un màxim. Aquesta situació és força habitual per als perfils de concentració i no tant per als perfils espectrals. S'aplica als perfils de concentració de processos en què la variable que es controla causa un efecte continuat en la mateixa direcció. En el cas de processos de fotodegradació, l'espècie que es degrada per acció de la llum no té sentit que torni a aparèixer si es continua irradiant la mostra. També s'aplica als perfils d'elució d'espècies pures (pics cromatogràfics). Existeixen diverses maneres d'imposar la restricció d'unimodalitat [de Juan, 1997; Bro, 1998]. L'aplicació d'aquesta restricció, generalment, consisteix en eliminar la part no unimodal d'un perfil (els màxims menors), substituint aquests valors per valors més petits que compleixin la restricció.

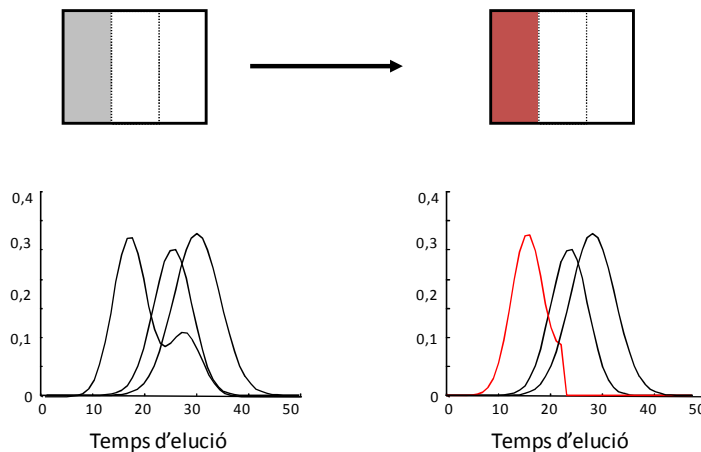


Figura 4.13. Representació gràfica de l'aplicació de la restricció d'unimodalitat.

Sistema tancat (closure): S'aplica en aquells sistemes en els quals se sap que la suma de concentracions de totes les espècies detectables és constant durant tot el procés (compliment de balanç de matèria) (vegeu Figura 4.14). Aquesta

restricció pot ser aplicada de dues maneres [de Juan, 2003]. La primera és forçant la suma de les concentracions a ser igual a un valor determinat i la segona és permetre que la suma de les concentracions sigui igual o inferior a aquest valor determinat. Si durant el procés d'optimització no s'aplica la restricció de sistema tancat sobre els perfils de concentració, és recomanable aplicar una restricció de normalització d'alçada o amplada als perfils espectrals, per tal d'evitar ambigüitats d'intensitat o d'escala durant l'optimització ALS (vegeu apartat 4.2.2.5.1).

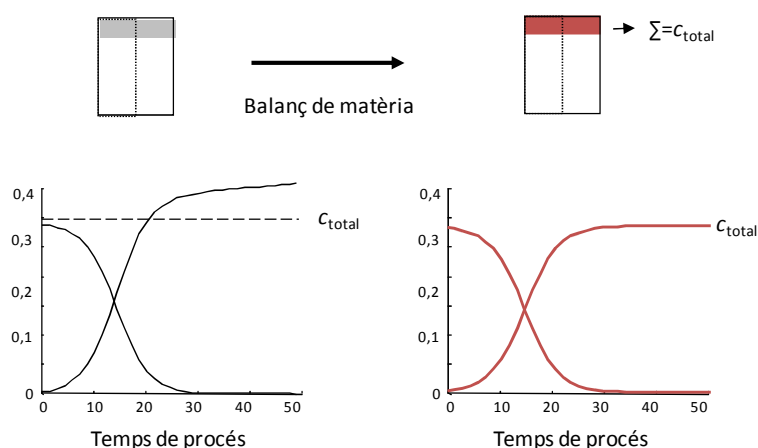


Figura 4.14. Representació gràfica de l'aplicació de la restricció de sistema tancat.

Selectivitat i rang local: És una restricció que permet indicar en la matriu de concentracions o espectres si en alguna regió del procés (o de l'elució) o en algun canal espectral només hi ha una espècie (selectivitat) o si, tot i no haver-hi selectivitat, algunes espècies del sistema són absents (rang local) [Tauler, 1995b]. Una mesura és selectiva quan el seu valor respon a la presència d'un sol component o espècie química. Les zones o regions de mesures selectives d'una matriu seran zones o regions de la matriu (submatrius) que tenen un

rang químic igual a 1. Aquesta restricció es pot fer explícita forçant a zero la concentració (o resposta) d'una espècie en aquelles regions on se sap que no existeix, mitjançant la variable *cse1* o *ssel* [de Juan, 2003; Jaumot, 2005]. S'aplica, per exemple, en la direcció de les concentracions, a l'inici d'un procés de degradació, quan només tenim el compost original. També es pot utilitzar el fet que alguna espècie no és present en algun temps de procés o en alguna finestra de temps d'elució (vegeu Figura 4.15). La informació de selectivitat o rang local en la direcció de les matrius s'obté mitjançant l'aplicació de mètodes d'anàlisi de rang local, com ara l'anàlisi de factors emergents (EFA), descrita a la secció 4.4.2.2, o la seva variant de finestra mòbil, Fixed Size Moving Window-EFA [Keller,1991].

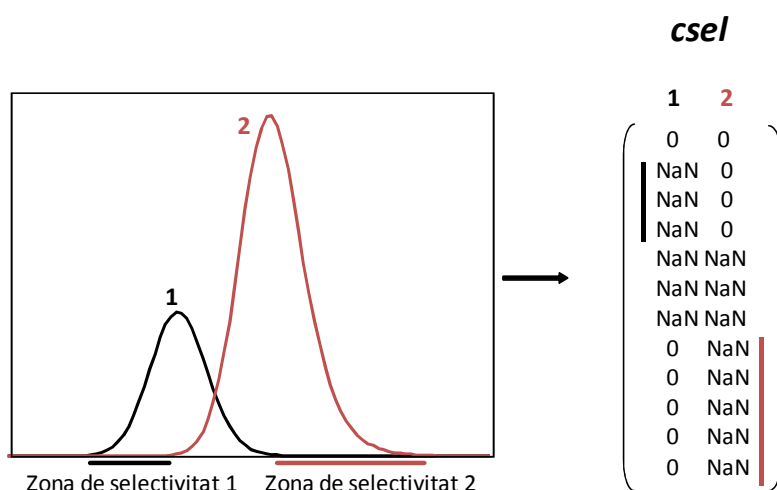


Figura 4.15. Representació gràfica de l'aplicació de restricció de selectivitat. Les línies horitzontals indiquen la zona de selectivitat per als compostos 1 i 2.

Aplicació de restriccions

És important aclarir que l'aplicació de les restriccions és sempre opcional i depèn de la matriu dels perfils de concentracions (\mathbf{C}) i de resposta (\mathbf{S}^T) del sistema analitzat. És, també, molt flexible, i es poden seleccionar restriccions diferents per a les matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T i dins de cadascuna d'aquestes matrius, també es poden restringir de forma diferent els diferents components presents. A més, moltes de les restriccions es poden aplicar amb graus diversos de tolerància segons el soroll de les dades o el grau d'acompliment de la condició definida per la restricció.

Les restriccions, si s'apliquen adequadament, milloren la definició i la interpretabilitat dels perfils obtinguts. En cas contrari, empitjoren significativament l'ajust del model i proporcionen perfils erronis.

A la Figura 4.16 es mostra de forma resumida l'aplicació del mètode de MCR-ALS per a una matriu de dades experimental \mathbf{D} , que correspon al seguiment d'un procés de fotodegradació per espectroscòpia d'absorció molecular.

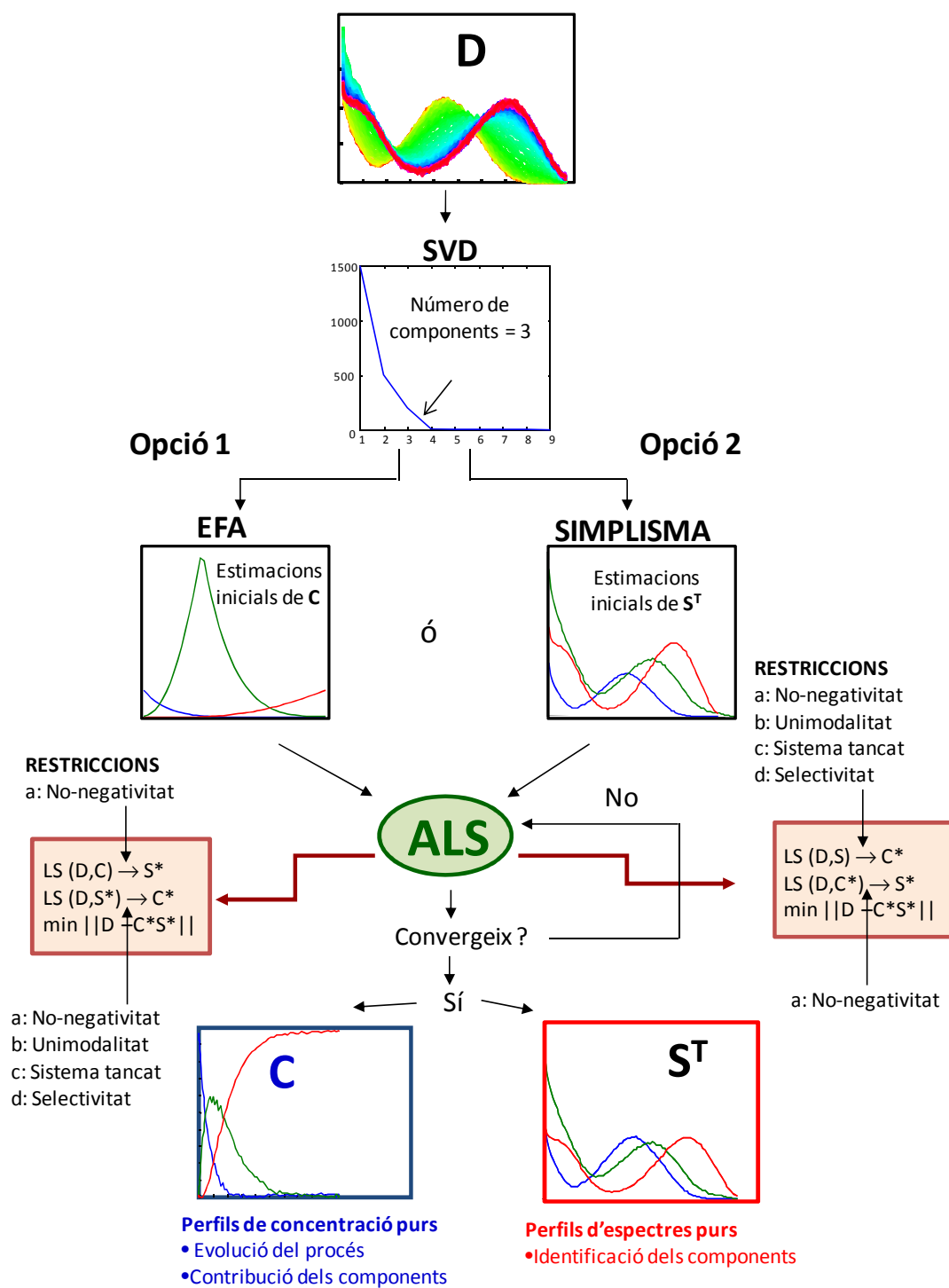


Figura 4.16. Esquema que descriu l'aplicació del mètode de MCR-ALS a l'estudi d'un procés de fotodegradació d'una matriu de dades **D** obtinguda per espectroscòpia d'absorció molecular.

En el context dels processos químics, al final del procés d'optimització s'obtenen (Figura 4.16):

a) Els perfils de concentració purs de les diferents espècies que participen en el procés. A partir d'aquest perfils podem:

- Conèixer l'evolució o contribució de cadascuna d'aquestes espècies.
- Postular un possible mecanisme del procés (model químic).

b) Els espectres purs de les espècies que participen en el procés. A partir d'aquests perfils podem identificar aquestes espècies (en particular, quan s'utilitza l'espectrometria de masses).

4.3.2.4. ANÀLISI SIMULTÀNIA DE MÚLTIPLES MÀTRIS DE DADES

Un dels principals avantatges que presenta el mètode MCR-ALS és que permet l'anàlisi simultània de múltiples matrius de dades. La construcció d'estructures multiconjunt (*multiset*) pot fer-se per augmentació de matrius per columnes (anàlisi de diferents mostres o experiments), per files (anàlisi de la mateixa mostra o experiments amb diferents tècniques) o per columnes i files alhora (anàlisi de diferents mostres o experiments realitzats amb tècniques diferents), tal com s'ha descrit en l'apartat 4.1.

La matriu augmentada per files \mathbf{D}_{aug} (vegeu Figura 4.2-a), que permet analitzar una matriu de dades d'un sistema utilitzant diferents tècniques espectroscòpiques (per exemple, absorció molecular i MS), també pot descompondre's en un model bilineal segons la següent expressió:

$$\mathbf{D}_{\text{aug}} = [\mathbf{D}_{\text{DAD}}, \mathbf{D}_{\text{MS}}] = \mathbf{C}[\mathbf{S}_{\text{DAD}}^T, \mathbf{S}_{\text{MS}}^T] + [\mathbf{E}_{\text{DAD}}, \mathbf{E}_{\text{MS}}] = \mathbf{C}\mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{aug}} \quad \text{Equació 4.25}$$

En aquest cas, s'obté una única matriu de perfils de concentració resolts (\mathbf{C}) i una matriu augmentada per files $\mathbf{S}_{\text{aug}}^T$ que conté els espectres purs resolts d'absorció molecular ($\mathbf{S}_{\text{DAD}}^T$) i els espectres de masses (\mathbf{S}_{MS}^T). \mathbf{E}_{aug} és la matriu de soroll o residuals, és a dir la part de la matriu \mathbf{D}_{aug} que no queda explicada pel model bilineal. En aquest cas, es proporciona una definició dels perfils del procés més robusta (\mathbf{C}) i unes respostes ($\mathbf{S}_{\text{aug}}^T$) que permeten discriminar millor entre compostos per la diversitat de la informació espectral utilitzada.

La matriu augmentada per columnes permet analitzar dades d'un mateix sistema o de diversos sistemes amb espècies comunes, seguits amb la mateixa tècnica espectroscòpica sota diferents condicions experimentals. Amb matrius augmentades en la direcció de les columnes, és possible analitzar el seguiment cromatogràfic de processos químics, ja que per a tenir la informació completa del sistema, cal analitzar tantes matrius cromatogràfiques com temps del procés de fotodegradació estudiats. De la mateixa manera que abans, la matriu augmentada per columnes \mathbf{D}_{aug} (vegeu Figura 4.2-b) també es pot descompondre en un model bilineal segons la següent expressió:

$$\mathbf{D}_{\text{aug}} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_1 \\ \mathbf{D}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{D}_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{C}_N \end{bmatrix} \mathbf{S}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \mathbf{E}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{E}_N \end{bmatrix} = \mathbf{C}_{\text{aug}} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{\text{aug}} \quad \text{Equació 4.26}$$

En aquesta ocasió, s'obté \mathbf{C}_{aug} , que és la matriu augmentada per columnes dels perfils de concentració resolts per a cada component en les diferents mostres o experiments, i \mathbf{S}^T , que és la matriu d'espectres purs dels compostos resolts

comuna a tots els experiments analitzats. Com en el cas de la matriu augmentada per files, els perfils espectrals de la matriu única S^T són més robustos i es pot tenir una millor definició dels perfils del procés (C_{aug}) ja que s'analitzen experiments en condicions diferents, que poden oferir informació complementària. Aquesta forma d'augmentar la matriu de dades experimentals, a més, fa possible:

- Analitzar si les espècies implicades en cada experiment són les mateixes
- Estudiar si l'evolució de les espècies implicades en un procés és la mateixa si s'efectua en diferents condicions experimentals.
- En el cas del seguiment cromatogràfic, obtenir l'evolució cinètica dels components a partir de la gràfica de les àrees dels pics cromatogràfics resolts en funció dels diferents temps de procés.

Finalment, les matrius augmentades en la direcció de les files i les columnes permeten l'estudi de diversos experiments seguits amb diferents tècniques espectroscòpiques i sota diferents condicions experimentals. De la mateixa manera que en els casos anteriors, la matriu augmentada per files i columnes, D_{aug} , (Figura 4.2-c) es pot descompondre en un model bilineal segons l'expressió:

$$D_{\text{aug}} = \begin{bmatrix} D_{1(\text{DAD})}, D_{1(\text{MS})} \\ D_{2(\text{DAD})}, D_{2(\text{MS})} \\ \vdots \\ D_{N(\text{DAD})}, D_{N(\text{MS})} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_N \end{bmatrix} [S_{\text{DAD}}^T, S_{\text{MS}}^T] + \begin{bmatrix} E_1 \\ E_2 \\ \vdots \\ E_N \end{bmatrix} = C_{\text{aug}} S_{\text{aug}}^T + E_{\text{aug}} \quad \text{Equació 4.27}$$

Aquesta manera d'augmentar les dades experimentals proporciona tots els avantatges que hem descrit per als casos anteriors. Ara s'obté C_{aug} , que és la

matriu augmentada per columnes dels perfils de concentració resolts per a cada component en les diferent mostres o experiments, i S_{aug}^T , que és la matriu augmentada per files d'espectres purs dels compostos resolts, formada pels espectres d'absorció molecular, S_{DAD}^T , i els espectres de masses (S_{MS}^T).

Per tant, el tractament simultani de diverses matrius fa que la solució obtinguda sigui de major qualitat, ja que inclou molta més informació en l'anàlisi, disminueixen les ambigüitats i, com a conseqüència, els perfils obtinguts són molt més robustos i estan menys afectats pel soroll experimental. A més, un bon disseny de matriu augmentada pot permetre 'trencar' la deficiència de rang en algun casos, tal com es veurà posteriorment.

En la Figura 4.17 es mostra una representació gràfica del model bilineal aplicat als diferents tipus de matrius augmentades.

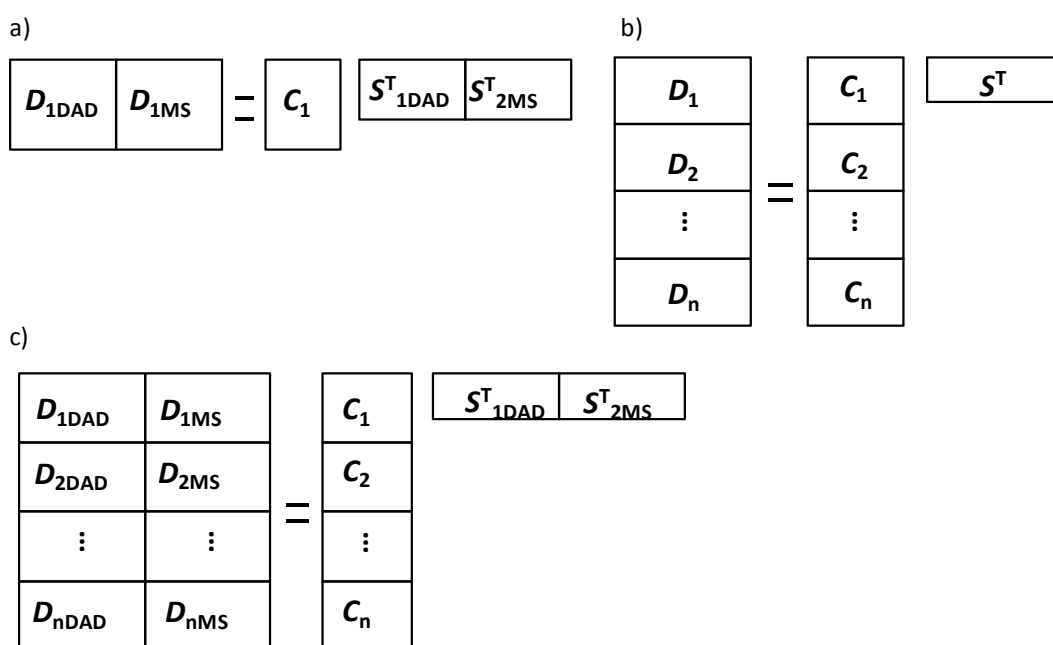


Figura 4.17. Representació gràfica del model bilineal aplicat als diferents tipus de matrius augmentades. (a) Model bilineal per a una matriu augmentada en la direcció de les files, (b) model bilineal per a una matriu augmentada en la direcció de les columnes i (c) model bilineal per a una matriu augmentada en la direcció de les files i de les columnes.

El procediment de resolució per MCR-ALS d'una matriu augmentada és similar a l'emprat per a l'anàlisi d'una sola matriu de dades. En la resolució de matrius augmentades es poden aplicar les mateixes restriccions descrites en l'apartat anterior. Les restriccions es poden aplicar de forma diferent a les diverses submatrius C_i i S_i^T , que formen les matrius augmentades C_{aug} i S_{aug}^T . A més, hi ha dues restriccions addicionals que es poden aplicar i que són:

Correspondència entre espècies [de Juan, 2009; Tauler 1995a]: Aquesta restricció s'utilitza per a l'assignació de les espècies presents a cada experiment. Mitjançant una matriu petita, que es designa amb el nom *isp*, s'incorpora al procés de resolució la informació relativa a la presència o absència d'espècies en un experiment determinat. La matriu *isp* tindrà un nombre de files igual al nombre de submatrius existents en la matriu augmentada C_{aug} i un nombre de columnes igual al nombre total d'espècies presents en tots els experiments analitzats simultàniament. L'assignació d'espècies en la matriu *isp* es fa amb un sistema de codificació binari. Una espècie absent es designa amb un 0 i una present amb un 1. L'efecte d'aquesta restricció és que, a les espècies absents, se'ls assigna un perfil de concentració nul. Per exemple, en el nostre cas, s'ha aplicat en l'experiment de seguiment cromatogràfic, quan tots els cromatogrames a diferents temps de procés es tracten conjuntament. S'indica que en la primera submatriu (a temps zero), només hi ha present el compost parental, mentre que en les següents submatrius totes les altres espècies poden ser potencialment presents.

Trilinealitat [Tauler, 1998]. Aquesta restricció permet forçar els perfils de concentració resolts del mateix component en les diferents submatrius (C_k) d'una matriu augmentada a tenir la mateixa forma. Aquesta restricció s'aplica quan les dades tenen el mateix nombre de files i de columnes i, a més, tenen el mateix comportament entre experiments. En general, la restricció de trilinealitat la compleixen poques dades químiques (per exemple, les dades d'emissió/excitació de fluorescència molecular, ja que la forma de l'espectre d'emissió i d'excitació d'un compost és la mateixa, independentment de la mostra en què es trobi). Les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques que s'han obtingut en la present memòria, no tenen comportament trilineal perquè, o bé corresponen a experiments cinètics amb comportament diferent, o bé són estructures multiconjunt cromatogràfiques, en què un mateix compost presenta variacions en el perfil d'elució (de posició i de forma) entre injeccions cromatogràfiques.

4.3.2.5. LIMITACIONS DEL MÈTODE MCR-ALS

4.3.2.5.1. AMBIGÜITATS EN ELS PERFILS RESOLTS

Els perfils de concentració i els espectres purs obtinguts en l'anàlisi individual d'un experiment amb MCR-ALS poden no ser els vertaders a causa de l'existència d'ambigüitats en la resolució [Abdollahi, 2011; Tauler, 1993, 1995b, 1997, 2001]. Es diu que hi ha ambigüitat quan parelles diferents de matrius C i S^T poden reproduir la matriu de dades original D , amb un ajust òptim i respectant les restriccions utilitzades en l'anàlisi. Hi ha tres classes d'ambigüitat associades als mètodes de resolució multivariant de corbes:

Ambigüitat de permutació de components: Es refereix al canvi en l'ordre dels components resolts. Aquest tipus d'ambigüitat no té massa importància i es pot solucionar simplement amb una ordenació adequada dels perfils en les estimacions inicials [Abdollahi, 2011].

Ambigüitat d'intensitat o d'escala: Es deu a que tant els perfils de concentració i els espectres es resolen escalats per un factor desconegut [Tauler, 1993]. Per tant, es complirà que:

$$\mathbf{D} = \sum_{i=1}^n \mathbf{c}_i \mathbf{s}_i^T \quad \text{Equació 4.28}$$

$$\mathbf{D} = \sum_{i=1}^n (\mathbf{c}_i k_i) \left(\frac{1}{k_i} \mathbf{s}_i^T \right) \quad \text{Equació 4.29}$$

I, per tant, qualsevol parella de perfils $(\mathbf{c}_i, \mathbf{s}_i^T)$ pot estar rescalada per un factor desconegut, k_i

La Figura 4.18 representa un exemple d'ambigüitat d'intensitat o d'escala. S'observa la resolució dels perfils espectrals i de concentració de dues solucions possibles amb la mateixa qualitat d'ajust i la mateixa forma dels perfils, però amb intensitats diferents.

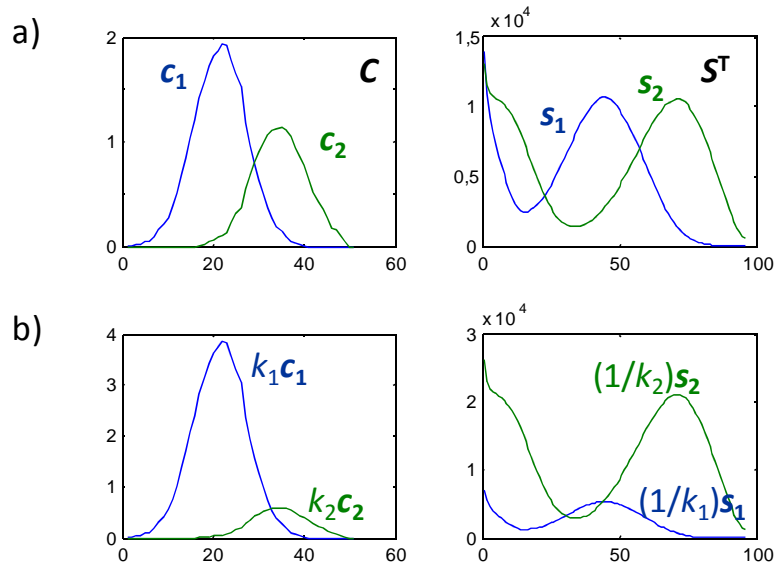


Figura 4.18. Representació gràfica de l'ambigüitat d'intensitat. (a) Solució real, (b) solució reescalable amb factors k_1 i k_2 .

L'ambigüitat d'intensitat no és un problema important en l'anàlisi qualitativa o en la identificació, però òbviament és un problema quan es volen recuperar valors de concentració reals. Aquesta ambigüitat se suprimeix amb l'aplicació de la restricció de sistema tancat o amb la normalització dels espectres resolts.

Ambigüitat rotacional: Aquesta és la font d'incertesa més important associada als perfils resolts. Per a una determinada descomposició de la matriu de dades experimentals D , sempre existeix un infinit nombre de matrius T invertibles que fan que la solució no sigui única, tal com es pot observar en la següent equació:

$$D = C S^T = C T T^{-1} S^T = (C T) (T^{-1} S^T) = C_{\text{nou}} S_{\text{nou}}^T \quad \text{Equació 4.30}$$

A aquesta ambigüitat també se la denomina de ‘forma’ perquè en funció de com sigui la matriu T , els perfils C i C_{nou} i els perfils S^T i S^T_{nou} poden tenir formes totalment diferents (vegeu Figura 4.19).

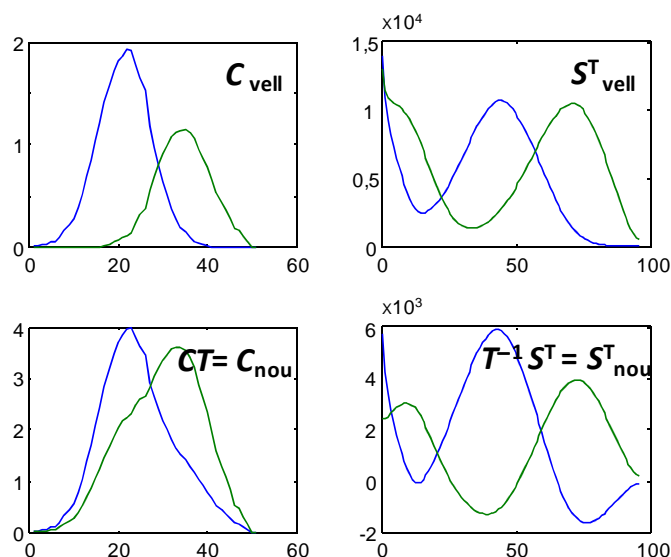


Figura 4.19. Representació gràfica de l’ambigüitat rotacional.

Els fenòmens d’ambigüitat estan presents quan el sistema estudiat no compleix certes condicions de selectivitat i rang local [Tauler, 1993, 1995b, 2001]. A conseqüència d’aquestes ambigüitats, els espectres purs o perfils de concentració resolts per MCR-ALS seran combinació lineal dels espectres o perfils de concentració vertaders desconeguts.

Manne [Manne, 1995] va postular una sèrie de condicions que cal que compleixin els conjunts de dades per tal de resoldre sense ambigüitats els perfils de concentració i els espectres d’un compost en una matriu de dades. Aquests teoremes es coneixen com els teoremes de resolució de Manne i són els que es citen a continuació:

- Teorema 1: Quan tots els components interferents que apareixen en l'interior de la finestra de concentració de l'anàlit apareixen també fora d'aquesta finestra, aleshores és possible el càlcul sense ambigüitats del perfil de concentració d'aquest anàlit.
- Teorema 2: Si per a cada interferent, la finestra de concentració de l'anàlit té una subfinestra on l'interferent no hi és present, aleshores és possible calcular l'espectre de l'anàlit sense ambigüitats.
- Teorema 3: Per a aconseguir la resolució correcta, només a partir de la informació proporcionada pel rang local en la direcció cromatogràfica, les condicions dels teoremes 1 i 2 no són solament suficients, sinó també necessàries.

Aquests teoremes mostren la importància que té el coneixement del rang químic local de la matriu de dades experimental. Un cop es coneix aquest rang químic local es pot comprovar si es compleixen els teoremes formulats per Manne [Manne, 1995] i deduir si és possible la resolució total o parcial del sistema en estudi.

En la Figura 4.20 es mostra un exemple d'un sistema que es pot resoldre sense problemes ja que compleix les condicions descrites pels teoremes i un altre exemple d'un sistema que no es pot resoldre completament. En la Figura 4.20-a es mostra la coelució de tres que es podran resoldre correctament, independentment de la forma dels seus espectres. Aquest fet, que sembla evident per als compostos 1 i 3, amb zones selectives, també ho és per al compost 2, que no en té cap, però per al qual les condicions de rang local són suficients. En la Figura 4.20-b, en canvi es mostra un tipus de coelució de dos compostos, un dels quals es troba totalment dins del perfil de l'altre compost.

En aquest cas els teoremes de Manne preveuen que només és possible resoldre correctament el perfil d'elució del compost **2**, ja que el compost **1** (interferent) es troba present tant dins de la seva finestra de concentració com a fora (teorema 1), i de l'espectre del compost **1**, ja que el compost **2** (interferent) no es troba en tota la seva finestra de concentració (teorema 2). Ara bé, el perfil del compost **1** i l'espectre del compost **2** estaran afectats pel fenomen d'ambigüitat rotacional.

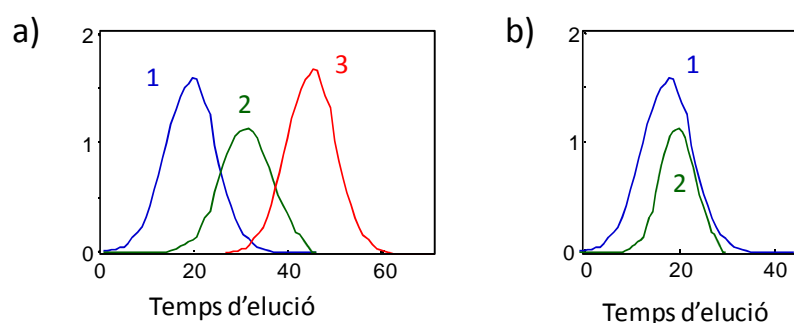


Figura 4.20. Exemple de coelucions de perfils d'elució que es poden resoldre totalment (a) i parcialment (b).

Aquests teoremes van ser formulats per a l'anàlisi d'una sola matriu de dades i es considerava només una direcció de mesura, la de concentració. Se'n pot fer l'extensió a l'anàlisi conjunta de més d'una matriu de dades (matriu augmentada) i també se'n pot fer l'extensió de forma similar a la direcció espectral. Les condicions dels teoremes són molt més fàcils d'assolir quan s'analitzen simultàniament diverses matrius correlacionades entre si, i només cal que es donin les condicions de resolució en una de les matrius analitzades simultàniament, i immediatament la resolució també serà possible per a la

mateixa espècie en les altres matrius analitzades conjuntament, encara que en elles no s'assoleixin les esmentades condicions [Tauler, 1995a].

Per tal de minimitzar, i eventualment, resoldre totalment aquestes ambigüitats, és aconsellable realitzar el tractament simultani de diversos experiments dissenyats apropiadament (apartat 4.4.2.4) [de Juan, 2006, 2009; Tauler, 1995a, 1995b]. Així, s'aconsegueix disminuir l'ambigüitat rotacional de forma considerable.

4.3.2.5.2. DEFICIÈNCIA DE RANG

Una altra limitació en l'aplicació del mètode de MCR-ALS per a l'anàlisi de les dades experimentals és el problema de la deficiència de rang [Amrhein, 1996; Izquierdo-Ridorsa, 1997; Saurina, 1998]. En l'apartat d'estimació de nombre d'espècies, s'ha vist que es tracta de la tria d'un nombre de components que correspongui al nombre d'espècies químiques presents en el sistema. La deficiència de rang es presenta quan el rang total de la matriu de dades és menor que el nombre d'espècies que contribueixen individualment al senyal mesurat, és a dir, es detecten menys espècies de les que realment estan presents. Aquest problema és conseqüència de la presència de dependències lineals en els perfils de les espècies en una de les direccions. Així, sistemes on els perfils de concentració (o perfils d'espectres) de les espècies presents en la mostra són idèntics o es poden descriure a partir de combinacions lineals d'altres, patiran deficiència de rang. Per exemple, un sistema amb un esquema de reacció $A + B \xrightarrow{k_1} C$ seguit per espectroscòpia d'absorció molecular seria un sistema deficient de rang, on és impossible resoldre mitjançant un únic experiment els perfils de les espècies A i B per separat, ja que els seus perfils

cinètics són idèntics. Així, el rang químic d'aquest sistema només podrà ser dos, encara que el nombre d'espècies químiques diferents sigui tres i encara que la forma dels d'A, B i C sigui fàcilment diferenciable.

L'estimació del rang d'una única matriu de dades corresponent a un sistema tancat de reaccions segueix la següent regla [Amrhein, 1996]:

$\text{Rang}(\mathbf{D}) = \min(\text{nombre de reaccions} + 1, \text{nombre d'espècies absorbents})$.

Amb aquesta regla queda confirmat que el rang de la matriu de dades del sistema anteriorment esmentat $A + B \xrightarrow{k_1} C$ és 2:

$\text{Rang}(\mathbf{D}) = \min(1 + 1, 3) = 2$.

Esbrinar si un sistema presenta deficiència de rang és un problema difícil de resoldre si no es té un cert coneixement previ del sistema que s'està estudiant. Per resoldre aquest problema, una possible solució és el tractament simultani de diversos experiments dissenyats apropiadament [de Juan, 2006, 2009; Tauler, 1995a, 1995b]. L'objectiu en l'estratègia d'augmentar matrius és 'trencar' la dependència lineal que pot existir entre els perfils de les matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T . D'aquesta manera, per tal de diferenciar els perfils que es confonen, s'han de concatenar a la matriu deficient de rang matrius que aportin informació complementària d'aquests perfils en condicions diferents. Això significa que l'augment de les matrius sempre s'ha de realitzar en la direcció en que hi ha la deficiència de rang. Per exemple, en el cas anterior del sistema de reacció deficient de rang $A + B \xrightarrow{k_1} C$, una estratègia a seguir seria concatenar

dues matrius on les quantitats inicials de A i B fossin diferents. En la Figura 4.21 s'il·lustra aquesta estratègia mitjançant la concatenació de dues matrius de dades que presenten deficiència de rang. Les concentracions inicials i la relació de les concentracions en l'experiment D_1 és $c_B=2c_A$ i en l'experiment D_2 , $c_A=3c_B$. La matriu dels perfils de concentració augmentada C_{aug} seria deficient de rang si la relació d'escala hagués estat única al llarg dels perfils de concentració. Com que les dues relacions d'escala són diferents en els dos experiments analitzats simultàniament, C_{aug} passa a tenir rang complet.

Aquestes i altres estratègies ja s'han proposat i utilitzat en l'estudi de sistemes deficientes de rang i s'han descrit en detall en treballs anteriors [Amrhein, 1996 ; Izquierdo-Ridorsa, 1997; Saurina, 1998].

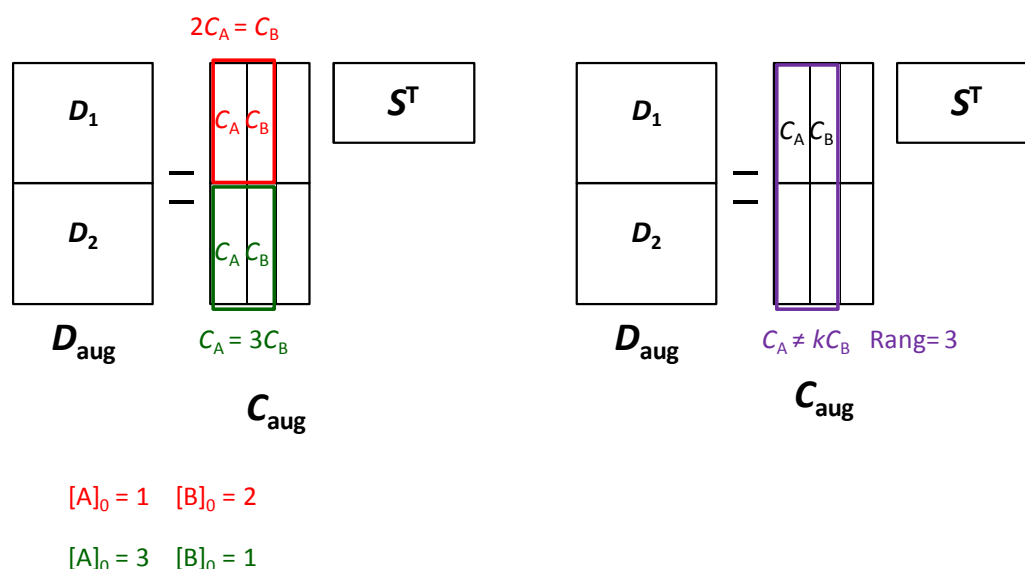


Figura 4.21. Estratègia per tal de 'trencar' la deficiència de rang amb l'anàlisi simultània de matrius.

Altres limitacions inherents a la modelització flexible

A més de les dificultats esmentades en apartats anteriors, tals com la possible presència d'ambigüitats, existeixen dues limitacions inherents a aquest tipus de mètodes i que afecten l'anàlisi de processos. D'una banda, la impossibilitat de recuperar paràmetres químics relacionats amb els models químics utilitzats en la modelització rígida. D'altra banda, el fet que les úniques espècies que poden ser modelades són aquelles que proporcionen senyal.

Per a superar algunes de les limitacions que presenta el mètode MCR-ALS i, en general, els mètodes de modelització flexible, es proposen les metodologies híbrides de modelització rígida i flexible, que es descriuen en el pròxim apartat.

4.3.3. MÈTODES DE MODELITZACIÓ HÍBRIDA RÍGIDA I FLEXIBLE

L'apartat 4.3.1 es referia a la utilització de les metodologies de modelització rígida. Amb aquests mètodes es forcen els perfils de concentració a seguir un model químic mitjançant ajustos no lineals. Aquestes metodologies ofereixen resultats excel·lents si el model proposat és l'apropiat i si tota la variació relacionada amb la resposta instrumental mesurada correspon als components que constitueixen el sistema. A més, s'obtenen els valors dels paràmetres del procés químic (constants cinètiques) amb els seus errors associats. Els resultats empitjoren si sorgeixen variacions incontrolables durant el procés o quan existeixen interferències absorbents que no estan incloses en el model proposat.

Per altra banda, l'apartat 4.3.2 concernia la utilització de les metodologies de modelització flexible, en particular del mètode MCR-ALS. Aquest mètode no fa ús de cap model químic explícit en el càlcul, per tant, no és necessari tenir un coneixement previ tant exhaustiu del sistema. També, cal destacar-ne la flexibilitat en l'aplicació de les restriccions, que permet l'adaptació del seu ús a diversos problemes químics. A més, totes les contribucions al senyal poden ser modelades i, per tant, es pot conèixer l'evolució dels perfils dels components involucrats en un procés en presència d'interferents, que també són modelats. En contrapartida, els resultats que s'obtenen amb aquest mètode estan subjectes a ambigüitats (solucions no úniques) i no s'obtenen els paràmetres del procés.

Un plantejament innovador és el d'incorporar els models químics, propis dels mètodes de modelització rígida, en les metodologies de modelització flexible per a aprofitar de manera simultània els avantatges d'ambdós tipus de mètodes. El resultat d'aquesta combinació són els mètodes de modelització híbrida rígida i flexible. En la present memòria s'utilitza una variant de l'algoritme MCR-ALS que incorpora una nova restricció de model rígida, que força alguns o tots els perfils de concentració de les espècies formades a seguir un model cinètic. S'anomena mètode MCR-ALS de modelització híbrida rígida i flexible (de l'anglès *hybrid hard- and soft-modelling* MCR-ALS, HS-MCR) [de Juan, 2000b].

El funcionament del mètode HS-MCR és pràcticament idèntic al que s'ha descrit anteriorment per a l'algoritme original de modelització flexible, MCR-ALS. L'única modificació important és l'aplicació de la restricció de model cinètic sobre alguns o tots els perfils de la matriu de concentracions C . Quan s'aplica la restricció de model cinètic, els perfils de concentració adopten la

forma definida pel model cinètic i, a més, en els resultats finals es recuperen els paràmetres ajustats mitjançant aquest model.

Amb el mètode HS-MCR, la resolució de la matriu \mathbf{D} , es fa de la mateixa manera que amb el mètode clàssic MCR-ALS.

Per tant, aquesta secció, només se centrarà en les variacions que aquest mètode presenta respecte el mètode MCR-ALS i els mètodes de modelització rígida.

4.3.3.1 INCORPORACIÓ DE LA RESTRICCIÓ DE TIPUS RÍGID

El mètode HS-MCR és una variant del mètode MCR-ALS que incorpora una nova restricció de model rígida (model cinètic en aquest cas). Per tant, el procediment del procés iteratiu per a optimitzar els perfils de concentració (\mathbf{C}) i els perfils d'espectres (\mathbf{S}^T), queda lleugerament modificat. Ara, els perfils de concentració obtinguts per mínims quadrats alternats segons l'equació 4.21 poden ser forçats a obeir la forma definida per un model cinètic. Així doncs, es generen uns perfils de concentració que obeeixen un model cinètic (\mathbf{C}_{MR}) i que s'ajusten als perfils de concentració obtinguts pel càlcul de mínims quadrats alternats (\mathbf{C}_{MF}). L'ajust no lineal es realitza utilitzant l'algoritme de Newton-Gauss-Levenberg-Marquardt (NGL/M) [Maeder, 1990], tal com es feia en els procediments de modelització rígida. Un cop acabat l'ajust, els perfils de concentració ajustats (\mathbf{C}_{MR}) reemplacen els perfils inicials (\mathbf{C}_{MF}) i se segueix l'optimització habitual del mètode MCR-ALS.

La diferència amb els procediments de modelització rígida és que els residuals que s'han de minimitzar es defineixen com la diferència dels perfils de

concentració inicials obtinguts pel càlcul habitual de mínims quadrats alternats, C_{MF} , i els perfils de concentració optimitzats per l'ajust no lineal del model cinètic, C_{MR} .

$$ssq = \min || C_{MF} - C_{MR} || \quad \text{Equació 4.31}$$

Tal com s'ha descrit en els mètodes clàssics de modelització rígida, per tal d'aplicar aquesta restricció cal conèixer el model cinètic de la reacció i la concentració inicial de les espècies involucrades. També és necessari proporcionar una estimació de les constants de velocitat de les reaccions que tenen lloc. En aquest cas, la selecció del model cinètic i l'estimació de les constants de velocitat es fa utilitzant el coneixement previ químic i observant la forma dels perfils de concentració resolts en l'anàlisi de les dades mitjançant l'aplicació del mètode de modelització flexible MCR-ALS.

Com es pot observar en l'equació 4.31, l'ajust no lineal es fa directament sobre els perfils de concentració sense tenir en compte les contribucions espectrals (paràmetres no lineals), de la mateixa manera que en els mètodes clàssics de modelització rígida. Els resultats obtinguts són els perfils de concentració C_{MR} . Aquests perfils C_{MR} reemplacen els perfils de concentració inicials obtinguts per restriccions flexibles, C_{MF} , i s'obté com a informació addicional les constants cinètiques.

A continuació, es recalcula la matriu reproduïda de dades original a partir del producte d'aquests perfils de concentració i dels perfils espectrals resolts. Si la matriu de dades calculada (D_{calc}) és suficientment semblant a la matriu de dades experimentals (D) es finalitza el procés iteratiu i s'adopten C i S^T com a

solucions finals. En cas contrari, s'utilitzen aquestes matrius dels perfils de concentració \mathbf{C} o espectres \mathbf{S}^T i les constants cinètiques ajustades com a estimació inicial per a un nou cicle iteratiu. El procés iteratiu es dona per finalitzat quan es compleix el criteri de convergència que s'ha establert a l'inici de l'optimització o quan s'ha arribat a un nombre preseleccionat d'iteracions, de la mateixa manera que el mètode clàssic MCR-ALS.

A la Figura 4.22 es mostra, en forma d'esquema resum, l'aplicació del mètode de HS-MCR a una matriu de dades experimental \mathbf{D} corresponent al seguiment d'un procés de fotodegradació per espectroscòpia d'absorció molecular.

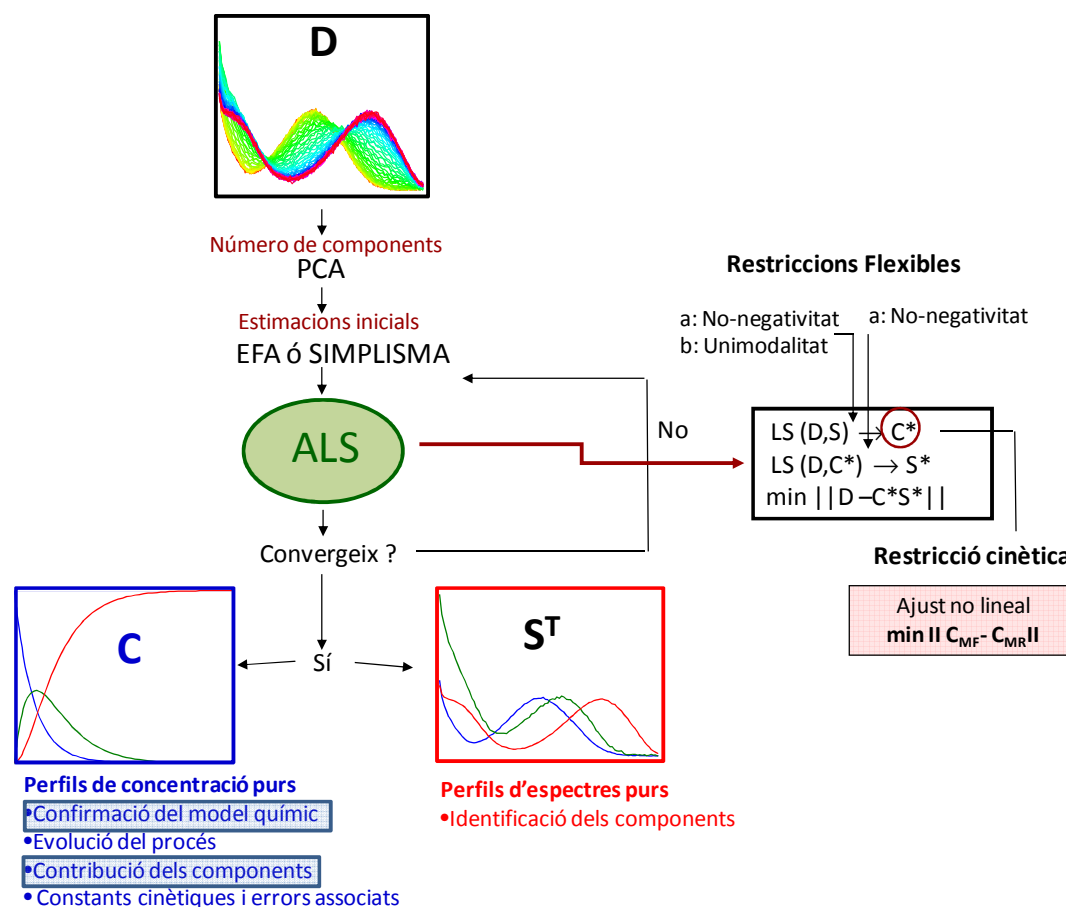


Figura 4.22. Esquema que descriu el mètode de HS-MCR. Exemple d'un procés de fotodegradació en l'anàlisi HS-MCR d'una matriu de dades **D** obtinguda per espectroscòpia d'absorció molecular.

L'aplicació de l'algoritme HS-MCR proporciona en el context dels processos químics (vegeu Figura 4.22):

a) Els perfils de concentració purs de les diferents espècies que participen en el procés, millor definits que amb el mètode MCR-ALS. A partir d'aquests perfils es pot confirmar el model cinètic proposat i conèixer:

- L'evolució i la contribució de cadascuna de les espècies presents en el sistema.

- El valor de les constants cinètiques i els seus errors associats.

b) Els espectres purs de les espècies que participen en el procés. A partir d'aquests perfils es poden identificar aquestes espècies.

4.3.3.2. AVANTATGES DEL MÈTODE HS-MCR

Informació addicional i disminució de les ambigüitats

La modelització híbrida combina els avantatges que presenten la modelització rígida i la modelització flexible i supera algunes de les limitacions que presenten aquestes metodologies quan s'utilitzen individualment.

A causa de la incorporació de la restricció de model rígida, s'aconsegueix obtenir els valors de les constants cinètiques del procés conjuntament amb els seus errors associats, de la mateixa manera que s'obtenen amb els mètodes clàssics de modelització rígida. Això causa una disminució de l'ambigüitat rotacional en tots els perfils resolts i la supressió total d'aquesta ambigüitat en els perfils de concentració que obeeixen el model cinètic [Golshan, 2011], amb la qual cosa la informació cinètica obtinguda és tan robusta com la proporcionada pels mètodes de modelització rígida.

Modelització d'interferències

La versatilitat de la metodologia de treball, com en el mètode clàssic MCR-ALS, permet seleccionar les espècies a les que es vol ajustar el model cinètic i deixa la possibilitat de modelar altres espècies que no estan presents en el procés, però que presenten resposta instrumental, de manera flexible [de Juan, 2001; Diewok, 2003; Blanchet, 2009; Mas, 2008; Amigo, 2006a,

2006b]. La possibilitat de modelar un procés en presència d'interferents és una de les grans diferències entre el mètode HS-MCR i els mètodes clàssics de modelització rígida. Això s'entén observant el tipus d'informació ajustada mitjançant el model cinètic. Mentre en la modelització rígida, s'ajusta la matriu de dades original \mathbf{D} on tot el senyal mesurat conté la informació barrejada de components del procés i interferents, l'algoritme HS-MCR ajusta perfils de concentració, que diferencien clarament les espècies que participen en el procés (perfils ajustats) dels interferents (que es deixen fora de l'ajust). En la Figura 4.23 s'exemplifica la modelització d'un procés en presència d'un interferent mitjançant el mètode HS-MCR. En aquesta figura, els tres primers perfils de concentració de la matriu \mathbf{C} (les tres primeres columnes) s'ajusten al model químic i els perfils ajustats reemplacen els originals. En canvi, el quart perfil de la matriu \mathbf{C} (la quarta columna) que representa l'evolució d'un interferent, es deixa lliure i es modela de forma flexible.

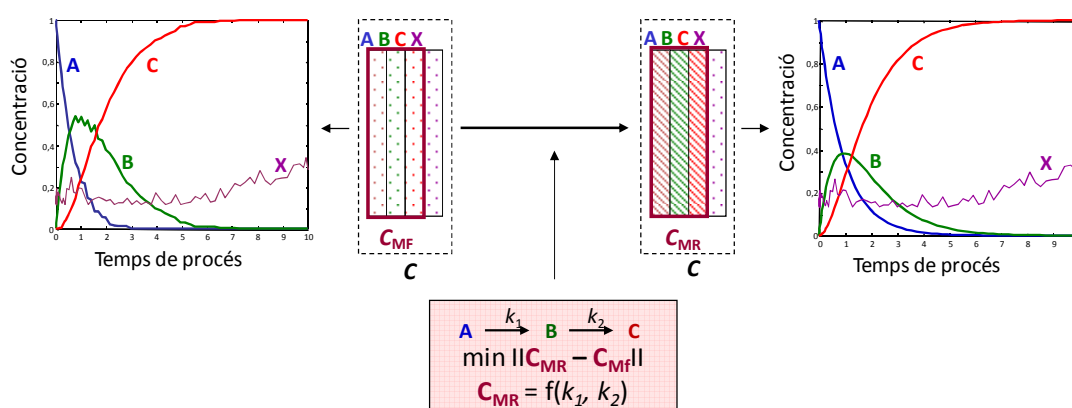


Figura 4.23. Exemple de la possibilitat de modelar correctament un procés cinètic en presència d'una espècie interferent, però que presenta resposta instrumental.

Anàlisi simultània de múltiples matrius de dades

El mètode HS-MCR també permet fer l'anàlisi simultània de múltiples matrius (matriu augmentada, \mathbf{D}_{aug}). De la mateixa manera que amb el mètode MCR-ALS, es pot modelar de forma independent cada submatriu dels perfils de concentració en matrius augmentades. Així, aquesta nova modalitat HS-MCR presenta una altra diferència envers els mètodes clàssics de modelització rígida, en què tots els experiments han de seguir un model únic o, si segueixen models diferents, són necessàries les expressions que descriuen la relació entre ells. Amb el mètode HS-MCR es poden analitzar simultàniament experiments que s'han realitzat en diferents condicions i que, per tant, segueixen models cinètics diferents. Per exemple, es poden analitzar simultàniament experiments que s'han dut a terme a diferents temperatures [de Juan, 2001], a diferents intensitats lumíniques [Blanchet, 2009], a diferents composicions de solvent [Mas, 2008], en diferents medis [Diewok, 2003; Amigo, 2006b], a diferents concentracions [de Luca, 2010], etc. En cas d'ús de més d'un model i a diferència dels procediments de modelització rígida, no cal que existeixi una relació entre els models utilitzats. Això és degut a que la relació entre tots els experiments analitzats conjuntament ja ve donada per la matriu \mathbf{S}^T , que participa de forma activa en l'optimització per mínims quadrats alternats.

En la Figura 4.24 es mostra un exemple d'anàlisi simultània d'experiments que presenten diferents models cinètics. En aquest cas, els experiments s'han realitzat en diferents composicions de solvent i cadascun d'ells s'ajusta a un model cinètic diferent.

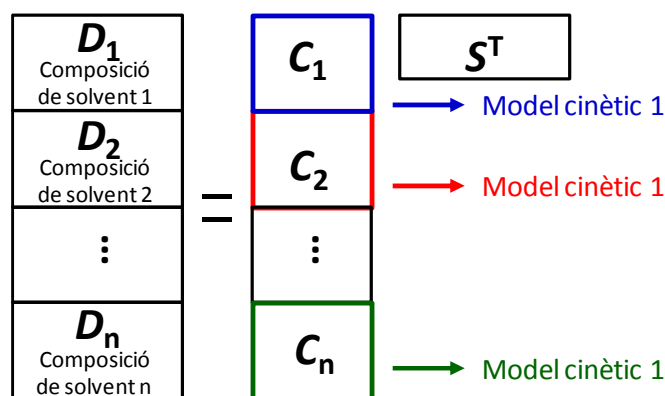


Figura 4.24. Anàlisi simultània d'experiments que s'han realitzat en diferents composicions de solvent i segueixen models cinètics diferents.

Aquest mètode però, també permet ajustar tots els experiments a un model global, com en els mètodes clàssics de modelització rígida, o utilitzar diferents models globals per a subconjunts d'experiments [Mas, 2008] tal i com es veurà en l'apartat de resultats. Malgrat això, l'ajust de cada experiment a un model individual també és útil per a detectar experiments atípics. Per exemple, quan es fan replicats del mateix experiment, l'ajust individual permetrà saber si entre els replicats hi ha algun experiment que presenta un comportament inesperat, i per tant, és convenient eliminar-lo.

El mètode HS-MCR, a més de permetre analitzar simultàniament experiments que segueixen models cinètics diferents i models cinètics globals, també permeten analitzar simultàniament experiments que segueixen models cinètics amb experiments que no segueixen cap model [Muñoz, 2007; Cutler, 2009; Mas 2011]. En la Figura 4.25 es mostra un exemple de la possibilitat d'analitzar simultàniament experiments que segueixen model cinètics amb experiments que no en segueixen cap. En aquest exemple, s'analitzen simultàniament les matrius que dona el seguiment cromatogràfic d'un procés

amb detecció UV, amb l'experiment obtingut per seguiment espectroscòpic. Els perfils d'elució del seguiment cromatogràfic del procés es modelen de forma flexible; en canvi, en l'experiment del seguiment espectroscòpic, els perfils de concentració s'ajusten a un model cinètic. En tots els casos, però, els espectres de les espècies comunes als dos tipus d'experiments són els mateixos. Aquest fet dóna una enorme fiabilitat als resultats obtinguts en seguir aquesta estratègia.

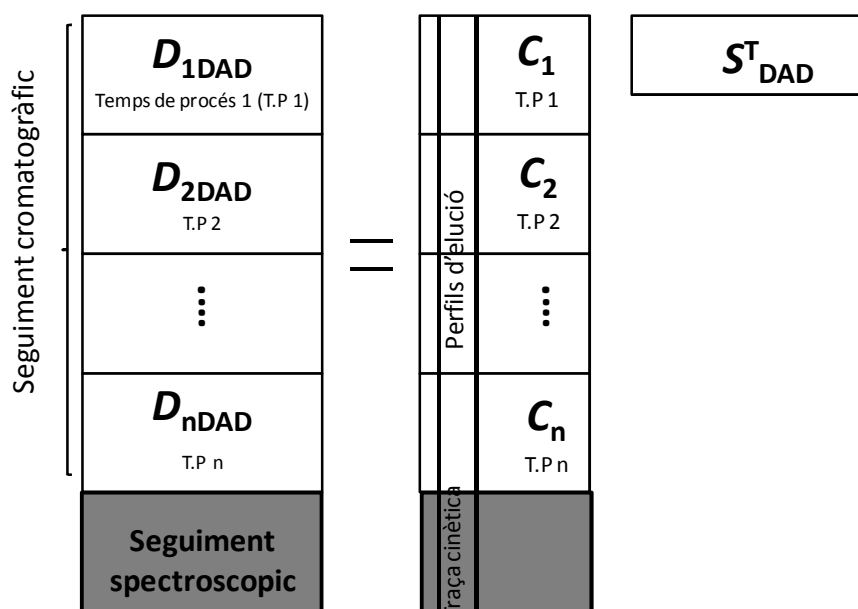


Figura 4.25. Acoblament del seguiment cromatogràfic amb el seguiment espectroscòpic.

Amb aquesta anàlisi simultània, s'inclou molta més informació de la que proporciona l'anàlisi dels dos experiments per separat. Per tant, s'obté una solució de major qualitat, es disminueixen les ambigüitats i es 'trenca' la deficiència de rang (molt freqüent en experiments de seguiment espectroscòpic) gràcies a la inclusió de la informació cromatogràfica.

4.3.4 COMPARACIÓ DELS PROCEDIMENTS DE MODELITZACIÓ DE PROCESSOS

Un cop descrites les diferents metodologies per a l'obtenció de les matrius \mathbf{S}^T i \mathbf{C} del model bilineal a partir de la matriu senzilla \mathbf{D} o augmentada \mathbf{D}_{aug} , es pot preveure que depenent de la naturalesa de les dades experimentals obtingudes en el seguiment dels processos químics, serà més recomanable utilitzar una o una altra estratègia. Cal esmentar que els mètodes de modelització descrits no són excloents i que moltes vegades la informació proporcionada per cadascun d'ells és complementària. A continuació, la Taula 4.1 resumeix les característiques principals de les metodologies de modelització rígida, de modelització flexible i de modelització híbrida rígida i flexible.

Taula 4.1. Principals característiques de les metodologies de modelització rígida, de modelització flexible i de modelització híbrida rígida i flexible.

	Mètode de modelització rígida	Mètode de modelització flexible. MCR-ALS	Mètode de modelització híbrida, rígida i flexible. HS-MCR
Modelització de processos sense mecanisme definit	No	Sí	Sí
Postulació d'un model	Necessari	No necessari	Necessari
Modelització d'interferències	No	Sí	Sí
Modelització d'espècies no absorbents	Sí	No	Sí
Anàlisi simultània (<i>multiset</i>)	Han de respondre a un mateix model global o a models individuals interconnectats	Sí	Sí
Ambigüitats	Presenten solucions úniques	Poden existir	Solucions úniques als perfils cinètics i possible ambigüitat en la resta
Paràmetres cinètics del procés	S'obtenen amb els seus errors associats	No s'obtenen	S'obtenen amb els seus errors associats

4.4. BIBLIOGRAFIA

[Abdollahi, 2011b]

H. Abdollahi, R. Tauler. *Uniqueness and rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution methods*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 108 (2011) 100.

[Amigo, 2006a]

J.M. Amigo, A. de Juan, J. Coello, S. MasPOCH. *A mixed hard- and soft-modelling approach to study and monitor enzymatic systems in biological fluids*. Anal. Chim. Acta 567 (2006) 245.

[Amigo, 2006b]

J.M. Amigo, A. de Juan, J. Coello, S. MasPOCH. *A mixed hard- and soft-modelling approach for the quantitative determination of oxipurines and uric acid in human urine*. Anal. Chim. Acta 567 (2006) 236.

[Amrhein, 1996]

M. Amrhein, B. Srinivasan, D. Bonvin, M.M. Schumacher. *On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 33 (1996) 17.

[Andraos, 1999]

J. Andraos. *The problem of distinguishability of rate constants in the two-step consecutive sequence $A \rightarrow B \rightarrow C$* . Can. J. Chem. 77 (1999) 565.

[Benvington, 2002]

P.R Benvington, D.K Robinson. *Data reduction and error analysis for the Physical Sciences*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, NY, US, 2002

[Bezemer, 2001]

E. Bezemer, S.C. Rutan. *Multivariate curve resolution with non-linear fitting of kinetic profiles*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 59 (2001) 19.

[Blanchet, 2009]

L. Blanchet, C. Ruckebusch, A. Mezzett, J.P. Huvenne, A. de Juan. *Monitoring and interpretation of photoinduced biochemical processes by rapid-scan FTIR difference spectroscopy and hybrid hard and soft modeling*. J. Phys. Chem. B. 113 (2009) 6031.

[Bro, 1998]

R. Bro, N.D. Sidiropoulos. *Least squares algorithms under unimodality and non-negativity constraints*. J. Chemom. 12 (1998) 223.

[Bugnon, 1994]

P. Bugnon, J.C. Chottard, J.L. Jestin, B. Jung, G. Laurenczy, M. Maeder, A.E. Merbach, A.D. Zuberbuhler. *2Nd-Order Globalization for the determination of activation parameters in kinetics*. Anal. Chim. Acta 298 (1994) 193.

[Cutler, 2009]

P. Cutler, P. Gemperline, A. de Juan. *Experimental monitoring and data analysis tools for protein folding: Study of steady-state evolution and modeling of kinetic transients by multitechnique and multiexperiment data fusion*. Anal. Chim. Acta. 632 (2009) 52.

[Diewok, 2003]

J. Diewok, A. de Juan, M. Maeder, R. Tauler. *Application of a Combination of Hard and Soft Modeling for Equilibrium Systems to the Quantitative Analysis of pH-Modulated Mixture Samples*. Anal. Chem. 75 (2003) 641.

[Dyson, 1997]

R.M Dyson, S. Kaderli, G.A. Lawrance, M. Maeder, A.D. Zunderbuhler. *Second order global analysis: the evaluation of series of spectrophotometric titrations for improved determination of equilibrium constants*. Anal. Chim. Acta 353 (1997) 381.

[Eilers, 2004]

P.H.C. Eilers, *Parametric Time Warping*. Anal. Chem. 76 (2) (2004) 404.

[Eilers, 2005]

P.H.C. Eilers, H. F.M. Boelens. *Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing*. October 21, 2005.

[Espenson, 1995]

J.H. Espenson. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*. McGraw-Hill, New York, 1995.

[Gans, 1992]

P. Gans, *Data fitting in the Chemical Sciences: By the Method of Least Squares*. 1st edn. Ed Wiley, New York, NY, US.

[Gans, 1976]

P. Gans, *Numerical-Methods for data-fitting problems*. Coord. Chem. Rev. 19 (1976) 99.

[Golshan, 2012]

A. Golshan, H. Abdollahia, M. Maeder. *The reduction of rotational ambiguity in soft-modeling by introducing hard models*. Anal. Chim. Acta 709 (2012) 32.

[Golub, 1970]

G.H. Golub.. *Singular value decomposition and least squares solutions*. Reinsch, Numer. Math. 14 (1970) 403.

[Golub, 1996]

G.H. Golub, C.F Van Loan, *Matrix computations*. 3rd. Edn. Ed. John Hopkins University Press, Baltimore, MD, US.

[Izquierdo-Ridorsa, 1997]

A. Izquierdo-Ridorsa, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler. *Second order multivariate curve resolution applied to rank deficient data obtained from acid-base spectrometric titrations of mixtures of nucleic bases*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 38 (1997) 193.

[Jaumot, 2005]

J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler. *A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 76 (2005) 101.

[de Juan, 1997]

A. de Juan, Y. van der Heyden, R. Tauler, D.L. Massart. *Assessment of new constraints applied to the alternating least squares method*. Anal. Chim. Acta 346 (1997) 307.

[de Juan, 2000a]

A. de Juan, E. Casassas, R. Tauler. *Soft modeling of analytical data, Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, Wiley, New York 2000.

[de Juan, 2000b]

A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler. *Combining hard- and soft-modelling to solve kinetic problems*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 54 (2000) 123.

[de Juan, 2001]

A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler. *Application of a novel resolution approach combining soft- and hard-modelling features to investigate temperature-dependent kinetic processes*. Anal. Chim. Acta 442 (2001) 337.

[de Juan, 2003]

A. de Juan, R. Tauler. *Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures- Revisiting latest trends in multivariate resolution*. Anal. Chim. Acta, 500 (2003) 195.

[de Juan, 2006]

A. de Juan, R. Tauler. *Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications*. Crit. Rev. Anal. Chem. 36 (2006) 163.

[de Juan, 2009]

A. de Juan, S.C. Rutan, M. Maeder, R. Tauler. *MCR Capítols* en: D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier: Amsterdam, 2009, pp. 207-558

[Keller, 1991]

H.R. Keller, D.L. Massart. *Peak purity control in liquid chromatography with photodiode-array detection by a fixed size moving window evolving factor analysis*. Anal. Chim. Acta 246 (1991) 379

[Lawson, 1974]

C.L. Lawson, R.J. Hanson. *Solving least-squares problems*. 1st edn. Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, US.

[de Luca, 2010]

M. de Luca, S. Mas, G. Ioele, F. Oliverio, G. Ragno, R. Tauler. *Kinetic studies of nitrofurazone photodegradation by multivariate curve resolution applied to UV-spectral data*. Int. J. Pharm. 386 (2010) 99.

[Maeder, 1990]

M. Maeder, A.D. Zuberbühler. *Nonlinear least-squares fitting of multivariate absorption data*. Anal. Chem. 62 (1990) 2220.

[Maeder, 2007]

M. Maeder, Y-M. Neuhold. *Practical Data Analysis in Chemistry*, Elsevier: Amsterdam, 2007.

[Maeder, 2009]

M. Maeder, N. McCann, S. Norman. *Model-Based Data Fitting* en D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 3, Elsevier: Amsterdam, 2009, pp. 413-436.

[Malinowski, 1991]

E.R. Malinowski. *Factor Analysis in Chemistry*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, 1991.

[Manne, 1995]

R. Manne. *On the resolution problem in Hyphenated Chromatography*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 27 (1995) 89.

[Marquardt, 1963]

D. W. Marquardt. *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. J. Soc. Ind. Appl. Math. 11 (1963) 431.

[Mas, 2008]

S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler. *Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach*. Anal. Chim. Acta. 618 (2008) 18.

[Mas, 2011]

S. Mas, R. Tauler, A. de Juan. *Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes*. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 9260

[Massart, 1997]

D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam, 1997.

[Mauser, 1998]

H. Mauser, G. Gauglitz. *Chemical Kinetics*, Elsevier, Amsterdam, 1998.

[Muñoz, 2007]

G. Muñoz, A. de Juan. *pH- and time-dependent hemoglobin transitions: A case study for process modelling*. Anal. Chim. Acta. 595 (2007) 198.

[Maeder, 2004]

M. Maeder, Y-M. Neuhold, G. Puxty. *Application of a genetic algorithm: near optimal estimation of the rate and equilibrium constants of complex reaction mechanisms*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 70 (2004) 193.

[Saeber, 1989]

G.A. Saeber, C.J. Wild. *Nonlinear Regression*. 1a ed. Ed. Willey, New York, NY, US.

[Saurina, 1998]

J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa. *Multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions*. J. Chemom. 12 (1998) 183.

[Stoer, 1993]

J. Stoer, R. Bulirsch. *Introduction to numerical analysis*. 2a ed. Ed. Springer, New York, NY, US.

[Tauler, 1993]

R. Tauler, B. Kowalski, S. Fleming. *Multivariate Curve Resolution applied to spectral data from multiple runs of an industrial-process*. Anal. Chem. 65 (1993) 2040.

[Tauler, 1995a]

R. Tauler. *Multivariate curve resolution applied to second order data*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 30 (1995) 133.

[Tauler, 1995b]

R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski. *Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution*. J. Chemom. 9 (1995) 31.

[Tauler, 1997]

R. Tauler, *Anàlisi de mescles mitjançant resolució multivariant de corbes*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 1997.

[Tauler, 1998]

R. Tauler, I. Marques, E. Cassassas. *Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data: Study of a spectrofluorimetric acid-base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths*. J. Chemom 12 (1998) 55.

[Tauler, 2001]

R. Tauler. *Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution*, J. Chemom. 15 (2001) 627.

[Walczak, 2000]

B. Walczak. *Wavelets in Chemistry*. Elsevier. Amsterdam, 2000

[Windig, 1991]

W. Windig, J. Guilmet. *Interactive Self-Modelling Mixture Analysis*. Anal. Chem. 63 (1991) 1425.

[Windig, 1993]

W. Windig, S. Markel. *Simple-to-Use Interactive Self-Modelling Mixture Analysis of Ftir Microscopy Data*. J. Molec. Struct. 292 (1993) 161.

CAPÍTOL 5:

Resultats i discussió

5.1. PROPOSTA DE METODOLOGIA QUIMIOMÈTRICA PER A L'ANÀLISI AMBIENTAL I AL SEGUIMENT I INTERPRETACIÓ DE PROCESSOS DE DEGRADACIÓ DE CONTAMINANTS ORGÀNICS

En aquest apartat es presenten els articles que proposen la utilització de mètodes quimiomètrics per a interpretar la informació present en les dades experimentals de tipus ambiental. En el primer article es fa una revisió bibliogràfica de les metodologies quimiomètriques més emprades en problemàtiques ambientals comunes, tals com són la determinació analítica, la presència i la distribució dels contaminants en el medi ambient i l'estudi de la seva toxicitat. En el segon article es pretén proposar una metodologia quimiomètrica per al seguiment i la interpretació de processos de degradació de contaminants orgànics, que és l'objectiu principal d'aquesta tesi.

5.1-I. Sílvia Mas, Anna de Juan, Romà Tauler, Alejandro C. Olivieri, Graciela M. Escandar. *Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review*. Talanta 80 (2010) 1052.

Aquest treball és una revisió bibliogràfica dels mètodes quimiomètrics més emprats en l'anàlisi de dades ambientals que involucren contaminants orgànics. Els principals temes tractats són: (a) la determinació analítica de contaminants (b) la caracterització de fonts de contaminació i de la seva distribució geogràfica i/o la seva evolució temporal i (c) la predicció de l'activitat toxicològica dels contaminants. Cada secció inclou una selecció de treballs relacionats amb contaminants tals com pesticides, hidrocarburs aromàtics policíclics i d'altres contaminants orgànics, entre els quals es troben els retardants de flama.

5.1-II. Sílvia Mas, Romà Tauler, Anna de Juan. *Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes*. Journal of Chromatography A 1218 (2011) 9260.

Aquest treball ofereix una nova metodologia per al seguiment i la interpretació dels processos de fotodegradació mitjançant tècniques cromatogràfiques i espectroscòpiques i l'anàlisi quimiomètrica de dades fusionades. Aquest article mostra que l'anàlisi d'estructures de dades acoblades de HPLC-DAD-MS i de HPLC-DAD/DAD proporciona descripcions molt completes de l'evolució cinètica i de la identitat dels productes generats durant els processos de fotodegradació. Per a mostrar els avantatges que presenta aquest tipus d'estratègia, s'ha escollit l'estudi de fotodegradació d'una substància model, el ketoprofèn. A partir dels resultats obtinguts, s'ha proposat un protocol metodològic (experimental i d'interpretació de la informació) aplicable a l'estudi de qualsevol procés de fotodegradació.



Review

Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review

Sílvia Mas^a, Anna de Juan^b, Romà Tauler^{a,*}, Alejandro C. Olivieri^c, Graciela M. Escandar^{c,**}^a Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain^b Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain^c Department of Analytical Chemistry, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario and Chemical Institute of Rosario (IQUIR-CONICET), Suipacha 531, Rosario S2002LRK, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2009

Received in revised form

22 September 2009

Accepted 24 September 2009

Available online 2 October 2009

Keywords:

Chemometric methods

Organic pollutants

Pesticides

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Environment

ABSTRACT

Organic pollutants include a very wide variety of chemical compounds with different structures, properties, functions and origins, which may produce diverse damages to the ecosystem and the human beings. This review presents the recent progress on the use of chemometrics to evaluate the occurrence of these substances in the environment. The main topics addressed are: (a) the problems related to the interpretation of the analytical measurements used in the determination of organic pollutants (*quantitative analytical determinations section*), (b) the profiling of the related environmental pollution sources through their compositional, geographical and temporal distribution patterns (*environmental exploratory studies section*) and (c) the prediction of the toxicological activity of these substances through models based on the use of structural or physical/chemical descriptors (*toxicity studies section*). Each section includes selected works related to pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and other organic pollutants.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1053
2. Quantitative analytical determinations	1056
2.1. Pesticides	1056
2.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons	1057
2.3. Other pollutants	1058
3. Environmental exploratory studies	1060
3.1. Pesticides	1060
3.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons	1061
3.3. Other pollutants	1063
4. Toxicity studies	1065
4.1. Pesticides	1065
4.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons	1065
4.3. Other pollutants	1066
Acknowledgements	1066
References	1066

* Corresponding author.

** Corresponding author. Tel.: +54 341 4372704; fax: +54 341 4372704.

E-mail addresses: escandar@iquir-conicet.gov.ar, gmescandar@hotmail.com (G.M. Escandar).

1. Introduction

In recent years, there has been a growing concern about the increasing environmental occurrence of persistent organic pollutants (POPs) [including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides] and emerging organic pollutants [e.g., brominated flame retardants (BFRs)] and the proven toxic potential of these compounds on human health and wildlife [1]. The existence of these harmful substances has disrupted the natural cycles and processes and, therefore, there is a need to obtain better and deeper knowledge on the organic pollutant discharge and the related environmental impact.

The increasing use of Chemometrics in environmental studies over the last two decades responds to the intensive research devoted to test and prove the power of data processing techniques in this field and to the availability of appropriate software. Three main areas of interest can be distinguished in chemometric environmental studies: quantitative chemical analysis, monitoring for environmental quality assessment and modeling and prediction of toxicological effects.

Difficulties on the quantitative chemical analysis of organic pollutants in environmental samples are linked to both the inherent complexity of these natural matrices and the low analyte levels to be quantified. The determination of organic pollutants in environmental samples is largely carried out using chromatographic techniques combined with specific detection schemes [2,3]. However, these methodologies are relatively expensive, time consuming and often require laborious sample treatment before analysis. Other authors have also proposed alternative strategies based on phosphorimetric and fluorimetric detection [4], which are suitable for the analysis of very low concentrations. Nevertheless, the spectroscopic measurement lacks the required selectivity, particularly when similar chemical compounds must be analyzed in complex samples. The lack of selectivity or the presence of interfering species linked to natural samples calls for the application of chemometric methods based on multivariate calibration techniques, in order to overcome these limitations and to complement these analytical methodologies.

Multivariate calibration methods focus on the establishment and application of mathematical models that relate multivariate instrumental signals with analyte concentrations or sample properties [5]. While in univariate calibration a single numerical value (scalar, zero-order data) per sample is recorded and analyzed, multivariate calibration works with increasingly complex data arrays per sample and allows analytical quantitative estimations in multicomponent systems lacking selectivity [6]. In first-order calibration methods, the response analyzed is a vector of numerical values (first-order data, e.g., spectra, voltammograms, time profiles) per each sample. The use of this information provides the so-called first-order advantage, i.e., the possibility to quantify an analyte in the presence of interferences, as long as the interfering compounds are present in the calibration samples during the establishment of the calibration model [7]. In second-order calibration methods, the instrumental response analyzed is a data matrix per sample (second-order data, e.g., an HPLC-DAD chromatogram or an excitation–emission fluorescence measurement). The so-called second-order advantage is achieved, which implies that the analyte contribution can be appropriately modelled, quantitatively estimated and resolved in the presence of unknown interferences, absent in the calibration samples [7]. Higher-order data sets and their related calibration strategies (higher-order tensors and higher-order calibration methods) are possible and improve resolution power and quantitative estimations.

The possibility to use very diverse instrumental responses to predict analyte concentrations explains why multivariate calibration methods have become very powerful analytical tools. Although

the first publications in this research area appeared about 30 years ago, a significant growth of applications of second- and third-order instrumental data to different areas of analytical chemistry has taken place in the last decade [8]. Second- and third-order multivariate calibration algorithms and applications have been reviewed and discussed [9]. Apart from second-order calibration algorithms, such as multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS) [10,11] and parallel factor analysis (PARAFAC) [12], other techniques have been proposed based on flexible data modelling, such as partial least-squares (PLS) with residual bilinearization (RBL), as recently discussed [8] and applied to environmental analysis [13–16].

Environmental monitoring studies result in huge amounts of physical parameters and chemical concentrations, collected in different geographical sites, time periods and/or different environmental compartments (i.e., air, water, sediments and biota). In order to reveal relevant patterns and sources of variation in these large environmental data sets, chemometric approaches based on statistical multivariate data analysis and factor analysis have been proposed in the last decades. The basic assumption of these methods is that the variation of each of the parameters or chemical concentrations measured in a particular sample can be mostly explained by a reduced number of different contributions coming from independent environmental sources [17]. In this way, point and diffuse pollution sources can be compositionally characterized and attributed to a particular origin (natural, anthropogenic, industrial, agricultural) and their relative apportionment can help to reveal geographical, temporal or compartmental patterns [18]. In this context, the application of chemometrics to environmental pollution research is often referred to as source apportionment, receptor modelling and/or mixture analysis discipline [19,20].

Principal component analysis (PCA) is a multivariate statistical method frequently used in exploratory data analysis [21]. This method extracts the main orthogonal contributions (principal components) which explain most of the variance of the data matrix. The abstract principal components may be rotated to increase interpretability. In some approaches, the rotated profiles can be quantitatively interpreted as possible sources, such as in absolute principal component analysis [22]. Sometimes, the interpretability of PCA is enhanced by the so-called varimax rotation [23], a change of coordinates that maximizes the sum of the variance of the loading vectors. However, these methods suffer from several drawbacks: individual factors (components) can be seldom attributed to a single specific source, fully satisfactory rotation techniques have not been found [24] and most of them cannot properly handle missing values or data below the detection limit, often encountered in environmental measurements. To solve the limitations of PCA-based methods, several factor analysis-based approaches have been developed over the past decade, such as UNMIX [25], positive matrix factorization (PMF) [26] and, more recently, MCR-ALS [10,11]. Both UNMIX and PMF have been adopted by the US Environmental Protection Agency (EPA) as robust methods (i.e., accurate for different operating conditions) for air quality management and can be freely downloaded from its web page (<http://www.epa.gov>). MCR-ALS was initially developed to investigate evolving processes of multicomponent systems by means of spectroscopic methods. However, its application was satisfactorily introduced in the study of environmental pollution data from sediment [27], water [28] and, more recently, for air quality management [29].

Assessment of environmental pollution in different geographical sampling sites requires consequent and constant monitoring of carefully selected parameters as a function of time, compartment or other environmental variables of interest. This usually results in data with multi-way structure, i.e., data cubes or hypercubes, which contain in each of the directions the conditions identify-

Table 1

Classification of the different chemometric methods employed in the works reviewed in this paper, according to the different data structures and goals of the study.^a

First-order calibration
Artificial neural networks (ANNs)
(i) Back-propagation neural network (BNN)
(ii) Radial basis function-artificial neural networks (RBF-ANNs)
(iii) Wavelet neural networks (WNNs)
Multiple linear regression (MLR)
Partial least-squares
(i) Partial least-squares (PLS)
(ii) Partial least-squares-1 (PLS-1)
Principal component regression (PCR)
Projection pursuit regression (PPR)
Second- and higher-order calibration and resolution methods
Absolute principal component analysis (APCA)
Bilinear least-squares (BLLS)
Factor analysis (FA)
Generalized rank annihilation method (GRAM)
Multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS)
Parallel factor analysis
(i) Parallel factor analysis (PARAFAC)
(ii) Weighted parallel factor analysis (WPARAFAC)
Partial least-squares
(i) N-way partial least-squares (N-PLS)
(ii) N-way partial least-squares with residual bilinearization (N-PLS/RBL)
(iii) Unfolded partial least-squares (U-PLS)
(iv) Unfolded partial least-squares with residual bilinearization (U-PLS/RBL)
Positive matrix factorization (PMF)
Trilinear decomposition (TLD)
Unfolded principal component analysis (U-PCA)
UNMIX
Unsupervised pattern recognition methods
Artificial neural networks (ANN)
Chemical mass balance (CMB)
Cluster analysis (CA)
(i) Fuzzy
(ii) Hierarchical (HCA)
Concentration weighted trajectory (CWT)
Multi-dimensional scaling (MDS)
Principal component analysis (PCA)
Polytopic vector analysis (PVA)
Potential source contribution function (PSCF)
Residence time weighted concentration (RTWC)
(i) Radial basis function artificial neural networks (RBF ANN _s)
(ii) Self-organizing maps (SOM)
Support vector machines (SVM)
Supervised pattern recognition methods
Artificial neural networks (ANN)
(i) Adaptive fuzzy partitions (AFP)
(ii) Adaptive neural network-based fuzzy inference system (ANFIS)
(iii) Back-propagation neural network (BNN)
(iv) Counterpropagation artificial neural network (CP-ANN)
(v) Multilayer perceptron (MLP)
Classification and regression tree (CART)
Discriminant analysis (DA)
(i) Linear discriminant analysis (LDA)
(ii) Non-linear discriminant analysis (NLDA)
(iii) Partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA)
(iv) Quadratic discriminant analysis (QDA)
(v) Regularized discriminant analysis (RDA)
(vi) Sparse linear discriminant analysis (SLDA)
K-nearest neighbours (KNN)
Nearest mean classifier (NMC)
Soft independent modelling of class analogy (SIMCA)

^a The theory behind the chemometric methods mentioned in this table can be found in books [5,43], reviews [8,9], and in the references cited in the presently reviewed application works.

Table 2
Analytical determinations.

Analyte	Multivariate method ^a	Sample and technique	References
Pesticides			
Captan, captafol, folpet	PLS, PCR, ANNs	River water by DC and DPP	[44]
Carbaryl, phoxim	PLS, PCR, RBF-ANNs	Tap, lake and pond water samples by kinetic/UV–visible	[45]
Chlordecone	PLS	Soil by NIRS	[46]
Carbaryl	PLS, PCR, BNN	Vegetables and water samples	[47]
Oxamyl, methomyl, resorcinol phenol, 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol	GRAM, PARAFAC, MCR-ALS	River and waste water by HPLC-DAD	[48]
Methomyl, deethylsimazine, deethylatrazine, carbendazim, carbofuran, simazine, atrazine, alachlor, chlorpyrifos-oxon, terbutryn, chlorfenvinphos, pirimiphos methyl, chlorpyrifos	MCR-ALS	Wastewater and sediment by HPLC-DAD	[49]
Methomyl, deethylsimazine, deethylatrazine, carbendazim, carbofuran, simazine, atrazine, alachlor, chlorpyrifos-oxon, terbutryn, chlorfenvinphos, pirimiphos methyl, chlorpyrifos	MCR-ALS	Wastewater and sediment by HPLC-MS	[50]
Alachlor, atrazine, carbendazim, carbofuran, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, deethylatrazine, deethylsimazine, methomyl, pirimiphos methyl, simazine, terbutryn	MCR-ALS	Wastewater and sediments by HPLC-DAD-MS	[51]
Alachlor, atrazine, chlorfenvinphos, pirimiphos methyl, terbutryn	MCR-ALS and calibration methods	Mussels by HPLC-MS in scan and SIM mode	[52]
Bifenthrin, tetramethrin	MCR-ALS, PARAFAC	Synthetic samples by GC-MS	[53]
Metsulfuron methyl and hydrolysis products	MCR-ALS	Synthetic samples by kinetic/NMR	[54]
Triphenyltin	MCR-ALS	Sea water by EEFMs	[55]
Carbendazim, fuberidazole, thiabendazole	PARAFAC	Synthetic samples by EEFMs	[56]
Carbendazim, fuberidazole, thiabendazole	GRAM, TLD	Water by EEFMs	[57]
Carbendazim, thiabendazole	PLS/RBL, PARAFAC	Water by EEFMs in solid-phase	[13]
Fenvalerate, lufenuron, deltamethrin	Three- and four-way PARAFAC	Synthetic samples by PI-EEKF	[58]
diflubenuron			
Carbaryl	PARAFAC	Water effluents by EEFMs	[59]
Fenitrothion, fenitrooxon	PARAFAC, U-PLS, N-PLS, U-PLS/RBL, N-PLS/RBL	River water by Ad-SSWV	[60]
3-methyl-4-nitrophenol			
Polycyclic aromatic hydrocarbons			
Benzo[a]pyrene, fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, benzo[b]fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene	PLS	Artificial drinking water by fluorescence	[61]
Sixteen EPA-regulated PAHs	PLS	Submerged freshwater sediments by LIF system and PFE-GC-MS	[62]
PAHs	PARAFAC	Synthetic samples by EEFMs	[63]
Benzo[a]anthracene, benzo[k]fluoranthene, dibenz[a,h]anthracene,	Three- and four-way PARAFAC	Synthetic samples by photocatalytic degradation EEFMs	[64]
PAHs	GRAM	Marine sediments samples by HPLC-DAD	[65]
Anthracene, pyrene, fluoranthene, 1-methylpyrene, 2,3-benzofluorene	TLD	Light gas oil sample by GC-MS	[66]
Dibenz[a,h]anthracene, benzo[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene	PARAFAC, MCR-ALS	Aqueous medium by photodegradation EEFMs	[67]
Pyrene, benzo[a]pyrene	PARAFAC, PLS/RBL	Artificial and real water samples by RT-EEPMs	[15]
Benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene	PARAFAC, PLS/RBL	Artificial and real water samples by EEFMs	[16]
Ten EPA-regulated PAHs	MCR-ALS, PARAFAC2	Artificial and real water samples by HPLC-FFSFS	[68]
Other organic pollutants			
Different organic compounds	PLS	Ambient aerosols by ATR-FTIR	[69]
Phenol, catechol, 4-acetamidophenol	WNNs	Synthetic water samples by voltammetry	[70]
Methoxy-2-propyl acetate, chlorobenzene	TLD and PARAFAC	Environmental sample containing fuel components, pesticides and natural products by GC × GC/TOFMS	[71]
2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo- <i>p</i> -dioxin	Four-way PARAFAC	Water samples by Shipol'skii spectroscopy	[72]
Tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline	N-PLS, PARAFAC, BLS	Water samples using photochemical-induced EEFMs	[73]
Antibiotics	MCR-ALS, U-PLS/RBL	Effluent wastewater by HPLC-DAD	[74]
Pyridine	N-PLS, PARAFAC	River water and field wastewater samples by pH-modulated UV data	[75]
1- and 2-Naphthylamines	U-PLS, RBL, PLS-1, N-PLS	Drinking waters by MIP-fluorescence optosensing system	[76]
Decabromo diphenyl ether	HS-MCR	Elucidation of the mechanism, resolution of kinetic profiles and pure spectra and evaluation of the rate constants	[77]

^a See acronyms in Table 1. Ad-SSWV, adsorptive stripping square-wave voltammetry; ATR-FTIR, attenuated total reflectance-Fourier transform infrared; DAD, diode-array detector; DC, direct current; DPP, differential pulse polarography; DPV, differential pulse voltammetry; EEFMs, excitation–emission fluorescence matrices; FFSFS, fast scanning fluorescence spectroscopy; GC, gas chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; LIF, laser-induced fluorescence; MIP, molecularly imprinted polymer; MS, mass spectroscopy; NIRS, near infrared spectroscopy; NMR, nuclear magnetic resonance; PFE-GC-MS, pressurized fluid extraction-gas chromatography-mass spectroscopy; PI-EEKF, photochemically induced excitation–emission kinetic fluorescence; RT-EEPMs, room-temperature excitation–emission phosphorescence matrices; SIM, selected ion monitoring; TOFMS time-of-flight mass spectrometry; UV–visible, ultraviolet–visible spectrophotometry.

ing the measurement (time, site, compartment, etc.). In certain cases, these data have been analyzed by unfolding them in large data tables, 'matricizing' them and employing bilinear models [28]. Alternatively, methods based on trilinear and multilinear models have been proposed for three- and multi-way data arrangements in the investigation of environmental problems, such as PARAFAC [12], TUCKER-3 [30] and multilinear engine (ME) [31]. More details and comparison of these methods can be found in the literature [29,32,33]. The use of multivariate factor analysis methods like those mentioned above has also been discussed in different books [5,18,20].

Organic pollutants often produce toxic effects. There are several *in vivo* and *in vitro* methods to test the toxicity of chemicals, which can provide reliable quantitative and qualitative indicators about the interaction of a given compound with a biological system. However, the direct estimation of the toxicological activity for a certain compound is expensive and time consuming and this explains the lack of available indicators for many compounds. Thus, the development of quantitative structure–activity relationships (QSAR) data analysis tools that allow for an indirect toxicity evaluation is of great importance for the purpose of pollutant risk assessment. QSAR models describe a mathematical relationship between the structural properties of a set of chemicals and the particular activity (toxicological or other), associated with them.

Several chemometric methods have been applied to develop valid and reliable QSAR models [34]. In a first phase, efficient methods are employed to select the most relevant parameters (descriptors) associated with the ranges of toxicity levels. Several selection strategies, based on methods, such as stepwise regression [35], PCA and genetic algorithms (GA) [36] have been proposed in the literature. The latter are probably the most powerful tools, since they are able to thoroughly explore the molecular descriptor hyperspace. The next step consists of using a chemometric method to develop robust predictive models. QSAR modelling techniques are based on: (1) linear regression, such as multiple linear regression (MLR) and PLS, (2) non-linear techniques, such as artificial neural networks (ANN) [37] and support vector machines (SVM) [37] and (3) classification methods [38]. In the present review, emphasis is directed to recently published QSAR models developed using chemometric methods beyond classical MLR.

Table 1 summarizes the different chemometric methods employed in the reviewed works, according to the different data structures and goals of the study. Detailed explanations about these methods can be found in previous works [39,40]. Data pre-processing techniques are not reviewed for brevity, in spite of their importance in the quality and interpretability of the results obtained.

The present paper reviews chemometric applications for the study of organic pollutants in the environment since 2000. Following the above discussion, we have organized the material in three sections: (1) quantitative analytical determinations, (2) environmental exploratory studies and (3) toxicity studies. In each section, rather than performing an exhaustive review, we critically selected some representative works, with the main purpose of showing the evolution of chemometric strategies and being representative of the different kinds of studied data sets. Attention is focused on families of compounds, such as pesticides, PAHs and other organic pollutants. Pesticides heavily influence water and soil pollution and they are defined as chemicals used to repel or destroy pests of any sort [41]. They include fungicides, insecticides and herbicides. PAHs, on the other hand, arise from the incomplete combustion of hydrocarbons. They consist of fused aromatic rings with no heteroatoms or substituents and they are toxic to aquatic life and suspected to be human carcinogens [42]. Other organic

compounds can disperse in various environmental media, due their water solubility, vapour pressure or partition coefficient between organic matter (in soil or sediment) and water, inducing potential hazardous problems in the ecosystem and in humans.

2. Quantitative analytical determinations

2.1. Pesticides

A summary of selected works devoted to analytical determination of pesticides is shown in Table 2 [44–77]. Most determinations were carried out in water samples because the main pathway of ecological impact is water contamination by pesticide runoff, which may easily reach both surface and ground waters. Despite the known analytical advantages of higher-order methods, many of the pesticide systems were analyzed using first-order algorithms [44–47] (Table 2). However, there are some examples of use of second-order calibration methods, such as MCR-ALS or PARAFAC to process high performance liquid chromatography (HPLC) or molecular fluorescence data.

In [48], three second-order calibration algorithms, GRAM, PARAFAC and MCR-ALS, were compared for the determination of mixtures of pesticides and phenolic compounds at trace levels in river and wastewater samples. The authors showed that techniques that do not require the fulfilment of trilinearity, such as MCR-ALS, provide better results than methods based on trilinear models, such as PARAFAC or GRAM, when drift and baseline problems occur. This is due to the fact that MCR-ALS only requires that one of the two measurement dimensions (usually the spectral one) matches between the different data matrices and, therefore, variations among drifts and baselines coming from different runs are allowed.

MCR-ALS was used to resolve and quantify 13 different biocides in sediment and wastewater samples by HPLC coupled to diode-array detection (HPLC-DAD) [49] and by HPLC coupled to mass spectrometry detection (HPLC-MS) [50]. Despite the very strong coelutions and matrix interferences, the analyzed biocides were properly resolved and their quantitation could be performed satisfactorily by external calibration. The difficulties encountered in practice for optimal reproducible quantitative determinations by HPLC-MS come from the combination of complex environmental matrices, embedded peaks, strong coelutions and ion suppression effects. Interestingly, the fusion of DAD and MS detector signals improved the results and provided more reliable estimations compared to those obtained using only one of the two detection systems, as was demonstrated in [51].

To cope with sensitivity changes and matrix effects encountered in the HPLC-MS analysis of complex natural environmental samples, as those mentioned in [52], different analytical calibration approaches, such as external calibration, standard addition and the use of an internal standard, were evaluated for the quantification of coeluting biocides in mussel samples. HPLC-MS data coming from the scan mode detection were processed using MCR-ALS [52]. The authors showed that the combination of the multivariate extension of standard addition and internal standard methods together with MCR-ALS was the best calibration strategy for the optimal analyte quantification. Similar quantitative results to those obtained by HPLC-MS in the selected ion monitoring (SIM) mode were achieved. Moreover, the scan mode MCR-ALS results provided analyte confirmation *via* its resolved pure mass spectrum, complete information about the whole chromatographic process and allowed for the simultaneous determination of multiple analytes in the same chromatographic run using the same experimental and instrumental conditions. An intermediate situation among the classical univariate SIM mode and the scan mode can be found in a work, where GC-MS data built with several SIM mode detection channels were

analyzed by PARAFAC and MCR-ALS to quantify two insecticides (bifenthrin and tetramethrin) in synthetic samples [53].

MCR-ALS was also applied in kinetic-spectroscopic studies of degradation or hydrolysis of pollutants to provide quantitative and qualitative information about these processes. The objective is then the identification of by-products and end products in the process and the postulation of the underlying reaction model with the related kinetic parameters. Along this line, Bezemer and Rutan have shown the applicability of MCR to resolve overlapped nuclear magnetic resonance signals using a kinetic reaction constraint in the determination of metsulfuron methyl and its hydrolysis products [54]. The use of the kinetic constraint applied during the iterations resulted in the direct estimation of the reaction rate constants. This avoids the need for subsequent fitting of the kinetic profiles, reducing the analysis time and complexity, with the possibility of modelling a particular process in the presence of interferences.

Excitation–emission fluorescence matrices (EEFMs) are the best examples of trilinear data sets and, therefore, all the available second-order methods are potentially applicable to them. However, phenomena such as Rayleigh and Raman scatterings and diffraction harmonics are not trilinear and should be avoided by selecting a suitable wavelength range or modelled with a specific algorithm, e.g., weighted PARAFAC (WPARAFAC) [9].

In [55], the application of MCR-ALS allowed the resolution and quantitative determination of triphenyltin in sea water samples using EEFM measurements and a single synthetic analyte standard. The method was successfully applied to the determination of the analyte at very low concentrations (part per trillion levels), with overall prediction errors around 12%. Ordinary PARAFAC, GRAM, MCR-ALS, trilinear decomposition (TLD) and the combination of PLS with RBL, all achieving the second-order advantage [9], were used to determine carbamate pesticides using fluorescence data [13,56,57]. In cases of trilinearity losses due to inner filter effects or sample-to-sample spectral variations (because analyte–background interactions may vary between samples), methods taking into account deviations from trilinearity (MCR-ALS or PLS/RBL) were preferable.

A problem which hinders a wider application of fluorescence spectroscopy in environmental monitoring is the intrinsic lack of selectivity in excitation and emission fluorescence measurements. Data sets obtained from kinetic experiments may help to increase the selectivity of spectroscopic determinations in the calibration models. Indeed, time-dependent measurements introduce an additional dimension to the classical EEFM three-way data sets (excitation \times emission \times sample), leading to four-way data sets (excitation \times emission \times sample \times time), which allow for a potential increase in the predictive ability of the models. Booksh and co-workers [58] extended EEFM determinations to four non-fluorescent pesticides after their photochemical degradation to fluorescent species. Three-way PARAFAC was employed to resolve the pure fluorescent spectra of the overlapping photolysis products. The time profiles yielded a fourth dimension (four-way data) that led to an increase in sensitivity and selectivity. The four-way PARAFAC models were then used to predict original pesticide concentrations. An analogous four-way PARAFAC model with kinetic information was successfully applied for the determination of carbaryl in effluent samples in the presence of an uncalibrated fluorescent background [59].

The adaptation of three-way stripping square-wave voltammetry (Ad-SSWV) to a second-order calibration strategy is described in [60] for the simultaneous determination of fenitrothion and its metabolites in environmental samples. To obtain the three-way data set, the Ad-SSWV profiles recorded at different accumulation times on the hanging mercury electrode were used as the third mode of the calibration data. In this way, the sensitivity of the electroanalytical signals was enhanced and the selectivity was

improved from the differences in shape in the kinetic species profiles originated by adsorption processes.

2.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons

The main difficulties linked to the determination of PAHs in environmental samples (Table 2) arise from the complexity of the sample natural background and the low analyte concentrations to be detected. However, the combination of different analytical methods with multivariate calibration has allowed for the successful determination of these pollutants. The luminescent properties of PAHs are useful for their direct analysis at very low concentration levels and have been widely exploited for PAH determination. Usually, fluorimetric methods involve recording synchronous fluorescence scanning EEFMs data, which are afterwards treated with suitable chemometric tools.

As can be seen in Table 2, many PAHs have been determined by coupling EEFMs with PLS and PARAFAC. In [61], PAHs were analyzed in synthetic drinking water by synchronous fluorescence spectroscopy and PLS. The use of a Plackett–Burman (PB) experimental design for the creation of the sample calibration data set is described and compared with a collinear analogue. External validation shows that the sample collinear data set is inappropriate to quantify PAHs in real samples, whereas the PB sample calibration data set affords optimal results.

Grundl et al. described a method for real-time *in situ* characterization of PAHs in freshwater sediments [62]. A cone penetrometer-type apparatus was designed for probe penetration and a field-portable laser-induced fluorescence (LIF) system was used for *in situ* measurements, in which the output of a pulsed exciter laser was transmitted by an optical fiber to a sapphire window in the probe wall. Fluorescent emission was collected by a separate optical fiber for transmission to the spectrometer on deck. Four wavelengths were selected via optical delay lines and multiple-wavelength waveforms were created. These waveforms contain information on the fluorescence frequency, intensity and emission decay rate. Field testing was conducted at ten different sites in the Milwaukee Harbor. The core samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and a PLS model was created based on laboratory LIF measurements and pressurized fluid extraction gas chromatography-mass spectrometry (PFE-GC-MS) of the core samples. The N-PLS model was applied then to the *in situ* field test data and 13 of the 16 EPA-regulated PAHs were quantified with a relative overall error lower than 30% (the remaining three PAHs were present under the quantification level).

A field-portable single-exposure excitation–emission matrix fluorometer was used together with PARAFAC for sub-ppb PAH determinations in the presence of spectral interferences [63]. It was found that reducing eight-sample PAH calibration sets to two or three calibration standards significantly decreased the computation intensity, yet generating adequate predictions. It was also found that spectral resolution can be decreased to reach an optimal compromise between calibration accuracy and analysis speed, while minimizing instrumental requirements.

The application of photocatalytic degradation EEFMs in combination with PARAFAC has been proposed to determine benz[a]anthracene, benzo[k]fluoranthene and dibenz[a,h]anthracene. Three- and four-way PARAFAC analyses were employed to extract the fluorescent species spectra from overlapping EEFMs [64]. The additional time dimension increased the selectivity for each PAH determination.

In [65], PAHs in marine sediment samples were determined by a method based on solvent extraction followed by chromatographic separation with diode-array detection. Second-order calibration with GRAM was used for quantification because interfering substances coeluted with the compounds studied. For calibration, a

spiked sample was used instead of a standard solution to cope with the complexity of the samples and the presence of matrix effects. With this method, the compounds do not need to be chemically separated from the interferences and quantification can be carried out with only one spiked sample for calibration. The ability of the method to quantify the studied compounds was comparable to the results with those of a univariate standard addition calibration, with the additional advantage of avoiding the previous isolation of the analytes.

Three-component (anthracene, pyrene, 1-methylpyrene) and four-component (fluoranthene, anthracene, pyrene, 2,3-benzofluorene) synthetic mixtures were resolved by TLD of third-order tensors formed by EEFM data modulated by the concentration of the fluorescence quencher nitromethane [66]. The addition of a quencher to PAH mixtures selectively reduces the fluorescence intensity according to the Stern–Volmer equation. TLD allows the three-way array to be decomposed to provide unique solutions for the excitation spectrum, emission spectrum and quenching profile for each component. TLD was applied to a real sample from a chromatographic cut from the analysis of a light gas oil and the TLD extracted spectra and quenching constants suggested the presence of three classes of PAHs, consistent with data from an independent GC-MS analysis.

PARAFAC and MCR-ALS were used to process EEFMs in order to obtain semi-quantitative information related to the concentrations of dibenz[*a,h*]anthracene, benz[*a*]anthracene, benz[*a*]pyrene and benz[*k*]fluoranthene stemming from a photodegradation process in an aqueous medium [67]. The results obtained showed no statistical differences with data obtained using an HPLC reference methodology and suggested the EEFM approach as a time saving and more ecological alternative.

Room-temperature excitation–emission phosphorescence matrices combined with second-order chemometric calibration were applied to the determination of pyrene and benzo[*a*]pyrene in both synthetic and real water samples [15]. The study was used to test the applicability of PARAFAC and PLS/RBL. The superior capability of PLS/RBL to model the profiles of potential interferences from other PAHs was demonstrated.

The simultaneous ultra-trace determination of benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,h*]anthracene in the presence of the remaining fourteen US-EPA PAHs at total concentrations ranging from 1400 and 14,000 ng L⁻¹ was reported [16]. The approach consisted of measuring EEFMs on a nylon-membrane surface, combining the ability of this membrane to retain and concentrate PAHs on its surface, the sensitivity of molecular fluorescence and the selectivity of second-order chemometric algorithms [PARAFAC and unfolded PLS/RBL (U-PLS/RBL)]. The superiority of U-PLS/RBL to quantify benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,h*]anthracene at concentrations below 10 ng L⁻¹ in tap, underground, mineral and river water samples was demonstrated.

PARAFAC2 and MCR-ALS coupled to HPLC-fast scanning fluorescence spectroscopy were employed for the analysis of ten selected PAHs (six of them heavy PAHs) in the presence of real interferences [68]. Analytical recoveries from different types of water and olive oil samples were analysed and the superiority of MCR-ALS to successfully resolve these clear non-trilinear complex systems was demonstrated.

2.3. Other pollutants

Table 2 collects analytical works on other organic pollutants. Courty and Dillner developed an ATR-FTIR spectroscopic method to quantify functional groups of organic compounds and ammonium sulphate and ammonium nitrate in size-segregated ambient aerosol samples for particles smaller than 1 µm in diameter [69]. The ATR-FTIR instrumentation and multivariate calibration

improved sensitivity and accuracy of quantification over more commonly used transmission FTIR and univariate calibration.

Multivariate calibration was used to quantify four carbonyl functional groups (aldehydes/ketones, carboxylic acids, esters/lactones and acid anhydrides), nine additional functional groups associated with organic molecules (methyl, methylene, aliphatic and aromatic CH, alkene, carbohydrate ether and hydroxyl, amino acids and amine groups) and two inorganic compounds, ammonium sulphate and ammonium nitrate. Comparison of the sum of the mass predicted by the ATR-FTIR technique and the gravimetric mass indicated that this method can quantify on average 91% of the aerosol mass. This method bridged the gap between individual compound identification with GC-MS and total organic carbon (TOC) obtained by thermal/optical methods and provided a nearly complete characterization of size-fractionated submicrometer aerosol mass. The method characterized the organic fraction in a potentially useful way for climate modelling, source region identification and physicochemical investigation of the properties of this large and complicated part of atmospheric aerosols.

Three phenolic compounds (phenol, catechol and 4-acetamidophenol) were simultaneously determined by voltammetric monitoring of their oxidation reaction at the surface of an epoxy-graphite transducer [70]. Because of strong signal overlapping, wavelet neural networks were used in the data treatment, in a nice combination of chemometrics and electrochemical sensors, already known as the electronic tongue concept.

The determination of methoxy-2-propyl acetate and chlorobenzene in an environmental sample containing fuel components, pesticides and natural products was carried out by GC × GC/TOFMS and TLD and PARAFAC [71]. It was found that PARAFAC initialized by TLD performed a better resolution than TLD. After resolution, mass spectral profiles were matched to library spectra for identification. Quantification by TLD-initialized PARAFAC using the standard addition method for one of the resolved analytes was proposed to avoid retention time alignment between sample and standard data sets.

The analysis of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin in water samples was carried out using solid-liquid extraction laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy. The measurement obtained provided four-way data that were processed by PARAFAC [72]. The work reported the first application of PARAFAC to high-order instrumental data generated from Shpol'skii matrices at liquid helium temperature. Moreover, the authors demonstrated the feasibility to directly determine parts per trillion of the target compound in heavily contaminated samples of unknown composition.

The antibiotics tetracycline, chlorotetracycline and oxytetracycline were determined in surface water samples using photochemical-induced EEFMs and three-way analysis [73]. Aqueous basic solutions of the antibiotics were irradiated with UV light and the generated photoproducts after solid-phase extraction were fluorometrically determined. According to the obtained results, while N-PLS and PARAFAC were not able to handle the extreme collinearities found, especially in the presence of uncalibrated interferences, bilinear least-squares (BLIS) rendered the best results. The authors presented BLIS as a promising technique for processing this kind of data, yielding analyte profiles and concentrations in samples where both a strong overlapping and background signal occur. In [74], U-PLS/RBL was applied for the first time to second-order LC-DAD data and compared with MCR-ALS for the simultaneous determination of eight tetracyclines in wastewaters. The results showed that the eight analytes could be successfully determined in wastewaters and the drawbacks due to matrix interferences could be adequately handled and overcome by using U-PLS/RBL. The use of a latent variable structure could cope with complex LC-DAD data, which do not follow a trilinear structure and provided comparable predictive results with MCR-ALS. One of

Table 3
Monitoring studies.

Compounds	Multivariate method ^a	Aim of the multivariate method in the study	References
Pesticides			
Pesticides and PAHs	PCA	Exploration of the main pollution sources and their geographical and temporal distribution in river sediments	[79]
Twenty-two pesticides	CA, LDA, PCA	Elucidation of the impact of pesticides used in soils. Spatial and temporal trends	[80]
Hexachlorobenzene, hexachlorobutadiene, hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyldichloro ethane and metabolites, polychlorinated biphenyls	PCA with orthogonal varimax rotation	Exploration of main pollution sources, their geographical distribution and their accumulation effects in river sediments and fishes	[23]
Fifteen herbicides and derivatives	PCA and MCR-ALS with unfolding scores	Identification of the pollution sources, determination of their composition, their temporal and geographical contributions in outflows of reservoirs	[28]
Nineteen pesticides	PCA and MCR-ALS with unfolded scores, TUCKER-3, PARAFAC	Exploration of the main pollution sources, their geographical and temporal distribution in surface waters	[81]
Seventeen pesticides	PCA with unfolded scores and geographical information systems	Geographical and temporal variation in sediments	[82]
Hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyltrichloro ethane, chlordane	PCA/MLR	Identification of main pollution sources and their contributions in soils	[83]
Pesticides	ANN models (BNN, RBF-ANNs, ANFIS)	Prediction of pesticide occurrence in rural domestic wells	[84]
Hexachlorobenzene, hexachlorocyclohexane, polychlorinated biphenyls, dichlorodiphenyldichloro ethane	PCA, PLS	Assessment of the dependence of pollution pattern on geographical and physiological parameters	[85]
Polybrominated diphenyl ethers, hexabromocyclo dodecane, polychlorinated biphenyls, dichlorodiphenyltrichloro ethane	PCA, SIMCA, PLS, PLS-DA	Correlations between biological characteristics and pollutant concentrations in eggs and muscle of birds	[86]
Organophosphorus compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons	PCA, PLS	Measured contaminant levels and general physicochemical parameters with biological responses	[87]
Polycyclic aromatic hydrocarbons			
Sixteen PAHs	CA, PCA with varimax rotation	Classification of the general distribution patterns or similarities of individual pollutants occurring in soil	[88]
Thirteen PAHs	PCA with orthogonal varimax rotation	Analysis of the emissions profile in a rural area identifying and quantifying the main sources in airborne particles	[89]
PAHs	PCA	Ecological risk assessment and source diagnostics	[90]
Twenty-three PAHs	PCA	Contamination of surface sediments and oysters	[91]
Fifteen PAHs	CMB	Apportionment of the pollution sources in lake sediments	[92]
Fifteen PAHs	FA, FA with non-negative constraints (rotation)	Apportionment of the pollution sources in lake sediments and comparison of results obtained in [92]	[93]
Fifteen PAHs	PCA, PCA/APCA	Identification and apportionment of the main pollution sources in urban atmosphere	[94]
Sixteen PAHs	Linear mixing model	Apportionment of pollution sources in soil taking into account the pattern of all 16 pollutants as a whole	[95]
PAHs	PMF, PCA/MLR	Identification and apportionment of pollution sources in soils	[96]
PAHs	PCA/MLR, PMF, UNMIX	Comparison of the methods of apportionment of pollution sources	[97]
Eight PAHs	PCA, ANN (SOM, MLP)	Identification of any patterns in air pollution occurring during heating and non-heating seasons	[98]
One hundred and thirty-six PAHs and biomarkers	PLS	Source allocation of oil spill	[99]
Twenty-four PAHs	PLS	Evaluation of the influence of physicochemical parameters and soil characteristics on the degradation patterns	[100]
Other organic pollutants			
Phthalate esters	PCA	Distribution patterns in urban soils	[101]
VOCs	CMB	Evaluation of source contributions to organic gases in ambient	[102]
Non-methane hydrocarbons	CMB, UNMIX	Estimation of pollution source profiles and their contributions in urban atmosphere	[103]
VOCs	CMB, NNLS	Relationships between VOCs and transient high ozone formation in the Houston area	[104]

Table 3 (Continued)

Compounds	Multivariate method ^a	Aim of the multivariate method in the study	References
Forty-eight non-methane hydrocarbons	PMF, UNMIX	Estimation of pollution source profiles and their contributions in urban atmosphere	[105]
Twenty VOCs	PCA/APCA, UNMIX, PMF, CMB	Estimation of pollution source profiles and their contributions in indoor exposure	[106]
VOCs	PCA	Source identification of personal exposure to fine particulate matter using organic tracers	[107]
VOCs	ME (missing/no missing mass)	Source identification and comparison of receptors models	[108]
VOCs	Non-parametric regression	Relationship of the concentration of VOCs to wind direction	[109]
Polychlorinated biphenyls	PVA	Identification and characterization of sources, dechlorination patterns and lateral and vertical distribution in soils	[110]
Polychlorinated biphenyls	PMF/PSCF	Identification and apportionment of pollution sources and their geographical and temporal distribution in atmosphere	[111]
Polychlorinated biphenyls	PSCF, CWT, RTWC	Locating sources contributing to the atmospheric concentrations in urban area	[112]
Eighteen endocrine disruptor chemical compounds	PCA, MCR-ALS	Exploration of the main pollution sources and their geographical distribution in coastal and harbour waters and sediments	[113]

^a See acronyms in Table 1. VOCs, volatile organic compounds.

the most important advantages of MCR-ALS is the physical meaning of the results obtained, absent in the U-PLS/RBL algorithm. However, U-PLS/RBL showed good analytical performance and ease and speed of program operation.

Pyridine, considered by US-EPA as a priority pollutant [1], was quantified in a concentration range of 0.67–51.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in river water and field wastewater samples, coupling pH-modulated UV-spectrophotometry with PARAFAC and N-PLS [75]. Both methods yielded satisfactory results.

Very recently, a chemometric-assisted molecularly imprinted polymer (MIP)-fluorescence optosensing system was developed for determining the contaminants 1- and 2-naphthylamine in drinking waters [76]. In this work, fluorescence emission spectra coupled to PLS-1 and EEFMs combined with N- and U-PLS were applied. The combinations of both N- and U-PLS with RBL allowed the achievement of the second-order advantage and satisfactory results were obtained in the presence of a potential interference (1-naphthalenemethylamine).

Decabromodiphenyl ether is the only polybrominated diphenyl ether (PBDE) of worldwide accepted use. However, it can degrade by the action of light into lower banned congeners in the environment. The photochemical degradation process of decabromodiphenyl ether was investigated by UV-spectrophotometric monitoring [77]. A novel hybrid data analysis approach, based on the combination of hard- and soft-multivariate curve resolution (HS-MCR), was applied to elucidate the mechanism of the degradation process, to resolve kinetic profiles and pure spectra of the photodegradation products and to evaluate the rate constants [78]. This method combines the qualities of deterministic (rate law) hard-modelling and of soft-modelling methods (no physicochemical model is assumed), allowing the simultaneous treatment of several experiments performed in different conditions with different kinetic models and rate constants in the presence of interferences.

3. Environmental exploratory studies

3.1. Pesticides

As seen in Table 3, PCA [21], PARAFAC [12], TUCKER-3 [30] and MCR-ALS [10,11] are the most commonly applied chemometric methods in environmental monitoring studies of pesticides. All these methods decompose an environmental data array into

separate linear contributions or components describing the main sources of data variance, which are related to the main contamination sources or patterns. The differences among these approaches lie in the specific assumptions and type of data structure and decomposition.

PCA has been extensively applied as an exploratory tool to characterize pesticide sources and/or to evaluate their geographical and/or temporal distributions in environmental monitoring programs. For example, in [79], PCA was applied to historical data from 1996 to 2003 concerning the concentration of different organochlorine pesticides and PAHs in sediment samples from different sampling sites of the Ebro River basin. Three major contamination sources were identified and their composition and distribution profiles were resolved. The first contamination source was mostly loaded by PAHs, the second contamination source was loaded by some organochlorine compounds and the third contamination source was more specifically loaded by naphthalene. Samples from the different geographical regions of the Ebro River basin were grouped according to the contamination described by these three major sources.

The use of unsupervised exploratory techniques, such as cluster analysis (CA) and PCA and a supervised classification technique, linear discriminant analysis (LDA) led to the successful elucidation of the impact of pesticides (Directive 91/676/EEC) on the intensive horticulture performed in a particular vulnerable geographical zone located in Portugal [80]. CA was used as an unsupervised exploratory technique to discover unanticipated natural affinities within the data, considering associations of both pesticides and samples. Clusters of samples were further examined with the assistance of LDA in order to check the discriminant capacity of the measured variables. Finally, PCA was applied to reveal the main sources of data variance, thus allowing the interpretation of eventual relationships between the pesticide abundance and typology and the environmental mechanisms or agrochemical procedures.

PCA results from analysis of environmental data can be further improved for interpretation after the so-called varimax rotation [23]. As an example, PCA and varimax orthogonal rotation were applied and compared to investigate the main pollution sources in the Catalonia rivers basin [23]. The goal of this study was the evaluation of the geographical distribution and accumulation effects of these pollution sources in sediment and fish samples. A clear correspondence was found between different pollution sources in fish and in sediments, dominated by pesticides and by PCBs, respec-

tively. The geographical distribution, including hot pollution spots and the temporal evolution of these sources was also described.

A multivariate study of environmental data requires the integrated application of different multivariate methods to reciprocally validate the models obtained. In [28], multivariate correlations among the concentrations of selected herbicides and their derivatives in outflows from selected reservoirs in US Midwest were investigated by PCA and MCR. Whereas PCA allowed the identification and qualitative interpretation of the main contamination sources, MCR-ALS resolved their composition, geographical and temporal distribution profiles. In this work, a preliminary method for averaging PCA and MCR-ALS geographical profiles over time was proposed as an efficient and useful way to enhance either hidden geographical or temporal information of contamination sources. Additionally, the averaged source profiles obtained by MCR-ALS could be easily compared with the source profiles obtained using three-way methods, such as PARAFAC or TUCKER-3. In [81], several chemometric methods, such as PCA, MCR-ALS, PARAFAC and TUCKER-3, were compared to resolve and model the main contamination sources of pesticides in surface waters of Portugal.

An interesting adaptation of the MCR bilinear algorithm to perform the data set decomposition following PARAFAC and TUCKER-3 models has shown the flexibility of the former method to handle different data structures and to set different constraint schemes [33]. When MCR-ALS is applied to three-way data via matrixization or matrix augmentation, trilinearity constraints may be implemented in a very flexible way using an algorithm previously developed [114]. A variant was developed to implement TUCKER-3 models using new component interaction constraints. The results obtained in this way could be easily compared to those obtained by classical PARAFAC or TUCKER-3 decompositions. TUCKER-3 models offer the advantage of defining a different number of components for each mode in the three-way data decomposition. This is of environmental significance, since it describes the real scenario of sources with different contamination patterns that may display a similar geographical or temporal distribution. A reduction of the number of components in the similar mode allows for an improved and more compact environmental description of the different contamination patterns.

Results of chemometric modelling and multivariate data analysis of large monitoring multivariate data sets may be coupled with geographical information systems (GIS) and mapping tools to facilitate the description of environmental patterns and to improve environmental knowledge and risk assessment. In [82], the environmental quality of the Ebro River delta (Catalonia, NE Spain) was assessed and the spatial and temporal distribution of pesticide pollution in the irrigation and drainage channels coming from the river during the rice-growing season were investigated in detail.

Receptor-based source apportionment of various potential pollution sources is also important in regional environmental management. Receptor models identify and quantify the sources of ambient air pollution and their effects at a site (receptor), primarily on the basis of concentration measurements at the receptor site and generally without the need of emission inventories and meteorological data studies [18]. PCA followed by varimax rotation, absolute scores recalculation and multilinear regression analysis (PCA/APCA, a popular receptor model [22]) have been used to apportion the different sources of contaminants (mostly inorganic particulate matter), especially in air pollution. The number of studies is smaller, however, in the case of organic pollutants. In [83], PCA with MLR analysis was used to distinguish the relative contribution of historic residues from current illegal usage of technical DDT and dicofol-type DDT in the Pearl River area (China).

Other non-linear chemometric methods have been applied to investigate pesticide contamination sources. Among them, three ANN models [a feed-forward back-propagation (BNN), a radial basis

function (RBF) and an adaptive neural network-based fuzzy inference system (ANFIS)] [38] were employed [84]. The BNN neural network was found to be superior to the RBF and to the ANFIS types of ANN in the detection of pesticide occurrences in wells.

In other similar studies, PCA and related techniques have also been used to determine correlations between pesticide contamination and particular environmental properties. For example, the relationship of the concentration of some pesticides and organochlorine compounds with geographical and physical parameters, such as altitude, longitude, latitude or temperature and with physiological or biological parameters, such as lipid content, age, weight and size in fish was investigated by PCA and PLS in [85]. The results confirmed that temperature and altitude were the main factors influencing the accumulation of most investigated compounds in the lipids of fish muscle and liver tissues.

PCA, PLS, soft independent modelling of class analogy (SIMCA) and PLS discriminant analysis (PLS-DA) were used [86] to investigate the correlation between biological characteristics and pollutant concentration in eggs and muscle of birds. In this work, PLS was applied to investigate the relationship between the biological variables of guillemot eggs and the residue levels of OCs and BFRs and to investigate whether concentrations of OCs and BFRs in guillemot egg covaried. SIMCA classification was used to investigate whether the contaminant pattern in the two matrices, egg and muscle, differed significantly from each other. SIMCA performs a classification model using PCA on selected observations (e.g., contaminant concentrations in the eggs) and then determines class membership by calculating the distance between a new observation (e.g., the contaminant concentrations in an individual muscle or in an egg) and the PCA model. PLS discriminant analysis (PLS-DA) was used to identify the discriminating variables that contributed the most to the class separation between egg and muscle contamination. A PLS-DA model showed that some of the contaminants had significantly higher concentrations in egg than in muscle, although 7 of the 14 contaminants showed no difference in concentrations between the two matrices. The concentrations of lower chlorinated biphenyls were higher in egg than in muscle. This might be due to absence/low activity of metabolizing enzymes in the egg and/or differences in lipid composition between the two matrices.

Multivariate techniques can also be used to relate measured contaminant levels and general physicochemical parameters to biological responses and to eventually find causality behind the emergence of the responses. In a recent work [87], environmental factors of industrialized and urbanized Llobregat river (NE Spain) affecting aquatic invertebrate communities were assessed using *Daphnia magna in situ* bioassays and biological indices based on community assemblages of benthic macroinvertebrates. To explore causal relationships between the studied environmental variables and parameters and the biological responses, PCA and PLS methods were used. The authors showed that environmental variables, such as habitat degradation, suspended solids, nitrogenous and conductivity related parameters affected macroinvertebrate assemblages. On the other hand, river levels of organophosphorus pesticides and PAHs were high enough to trigger the responses of *Daphnia magna in situ* bioassays.

3.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons

The high variability of PAHs concentrations according to the sampling site and to the environment (urban, rural, coastal and remote) requires a very careful evaluation and interpretation. Multivariate statistical approaches deliver substantial information on links among sampling sites and pollutant concentrations through latent factors responsible for the data set structure and pollutant sources allocated. Among these approaches, PCA and PCA with varimax rotation were the most used techniques.

As an example, Golobocanin et al. proved PCA and cluster analysis to be a very effective tool in finding patterns to explain PAH occurrence in surface soil. They found PAHs distributed in three groups, mainly according to the number of rings in their structure, for grossly contaminated areas [88].

PCA with varimax rotation has been used to identify contributing sources of particle-phase PAHs in rural areas of Candiota region, Rio Grande do Sul, Brazil [89]. The data analysis separated the compounds studied in 3 factors, grouping emissions from the combustion of coal and wood, vehicle emissions from the combustion of diesel oil and gasoline and emissions from unburned diesel oil and gasoline. This study also demonstrated the influence of weather parameters, such as rainfall and concentration of particulate matter, on the different PAHs present in the area under study; hence, physicochemical characteristics, such as size of particles and water solubility, are determinant to the distribution of these compounds in the atmosphere.

Distribution characteristics, probabilistic risk assessment and identification of possible sources of PAHs were investigated in the Yellow River delta (China) [90]. For PAH source identification, both diagnostic tools based on ratios of selected PAHs and principal component analysis (PCA) with multiple linear regression (MLR) analysis were studied, suggesting mixed sources of pyrogenic and petrogenic derived PAHs in this river.

23 PAHs were analyzed in surface sediments and oyster samples from the intertidal areas of Dar es Salaam (Tanzania) by GC-MS. Diagnostic indices and PCA were used to identify possible contamination sources. Interestingly, no correlation between sediment and oyster PAHs concentrations measured in the same sites was found. This conclusion was supported by completely different contamination patterns, suggesting different sources or accumulation mechanisms for both environmental compartments [91].

Different receptor models, such as chemical mass balance (CMB) [92], factor analysis (FA) with non-negativity constraints, PCA/APCA, UNMIX and positive matrix factorization (PMF) were used to determine the profiles and relative contributions of PAH sources in different environmental media.

CMB and FA with non-negativity constraints were the most used receptor models to apportion sources of PAHs. CMB uses historical emission source profiles that are assumed to be known and weighted regression methods to apportion their related mass. In CMB, the output does not include the source profiles because they are required inputs and are used to build the receptor models. Li et al. used CMB to apportion the major sources of PAHs found in the sediments of Lake Calumet and surrounding wetlands in southeast Chicago [92]. The results indicated the feasibility of applying CMB to pollutants found in aquatic sediments. To establish the fingerprints of PAH sources, 28 source profiles were collected from the literature. The profiles under the same source category were averaged and the fingerprints of six sources were established, including coke oven, residential coal burning, coal combustion in power generation, gasoline engine exhaust, diesel engine exhaust and traffic tunnel air. The results indicated that coke ovens and traffic are the two major sources of PAHs in the area. The average contribution from coke oven emissions ranged from 21% to 53% and that from traffic ranged from 27% to 63%. The pattern of source contributions also showed spatial and temporal variations. Bzdusek and Christensen used an FA model with non-negative constraints, which supported the results of the work mentioned above [93]. In addition, FA provided new insights, since wood burning and secondary coke oven profiles were not recognized in the CMB model studied by Li et al. [92]. This was the first application of an FA model for source apportionment of PAHs in sediments. This methodology does not require input of source profiles and provides factor loading and factor score plots, which can be interpreted as PAH source profiles and PAH source contributions, respectively.

A PCA/APCA receptor modelling approach has been proposed for the estimation of source contributions of PAHs in particulate depositions on near highway vegetation foliage in the urban environment of Lucknow City (India) [94]. PCA identified three major sources of PAHs, viz. combustion, vehicle emissions and diesel-based activities. Whereas APCA was used to quantify the contributions of all sources to each measured PAH, a subsequent MLR step related the sample mass concentration to the APCA-estimated mass concentration of each source. Finally, the PCA/APCA receptor modelling approach revealed that the combustion sources (natural gas, wood, coal/coke, biomass) contributed 19–97% to the total measured PAHs, vehicular emissions 0–70%, diesel-based sources 0–81% and other miscellaneous sources 0–20%. The chemically meaningful PCA/APCA receptor model enables their validation by comparison of estimated source profiles with literature data.

A linear mixing model using FA was proposed to identify site parameters that may influence the PAH concentrations in Swiss background soil and to assess whether it was possible to identify sources of PAH in background soils [95]. The application of the receptor model was performed taking into account the pattern of all 16 EPA regulated PAHs sources. The comparison of three soil profiles identified with a linear mixing model from the pattern of 16 PAH with more than 300 PAH emission profiles from the literature suggested urban dust, wood combustion and binders from asphalt as main PAH sources.

In [96], two receptor modelling methods (PCA with MLR and PMF) were compared to determine the profiles and relative contributions of the sources of PAHs and sulphur heterocycles in the sediments of Hamilton Harbour (Ontario, Canada) and surrounding harbour creeks. Both methods identified four factors and gave excellent correlation coefficients between predicted and measured levels of pollutant compounds and they assigned similar contributions from coal and tar/coal combustion sources to the harbour (19 and 26%, respectively). One PCA factor was identified as contributions from vehicular emissions (61%). PMF was able to differentiate vehicular emissions into two factors, one attributed to gasoline emissions sources (28%) and the other to diesel emissions sources (24%). Overall, PMF afforded better source identification than PCA with MLR. In PMF, an explicit least-squares approach is considered, which individually weights measured values by its estimated uncertainty [26]. This individual data point weighting in PMF has been stated to outperform eigenbased analysis methods, such as PCA, since it deals better with values below the detection limit (DL) and with missing data and takes into consideration the real uneven uncertainty associated with the analyzed values [115]. Other weighted least-squares-based approaches (MCR) have also been recently proposed for the same purposes [29].

In another study [97], two eigenbased source apportionment methods (PCA with MLR and UNMIX [25]) and one non-eigenbased source apportionment method were applied and compared to determine the sources of PAHs in ambient air in Baltimore, MD (USA). Overall source contributions compare well among methods. Vehicles, both diesel and gasoline, contribute 16–26%, coal 28–36%, oil 15–23% and wood/other having the greatest disparity, 23–35% of the total (gas plus particle-phase) PAHs. Seasonal trends were found for both coal and oil. Coal was the PAH dominating source during the summer, while oil dominated during the winter. The information obtained from the different techniques is complementary and allows for a deeper and more reliable interpretation of the resulting source profiles. PMF was the only method to separate diesel from gasoline sources.

An ANN approach to the analysis of seasonal air pollution (e.g., PAHs) within the area of the city of Gdansk was introduced by Wesolowski et al. [98]. They applied two different types of ANN: multilayer perceptron (MLP) and SOM. MLP was used as a tool to predict the season in which a certain sample was collected and

SOM was applied for sample mapping to recognize similarities. This study also presented the comparison between two projection methods, linear (PCA) and non-linear (SOM), to extract valuable information from multi-dimensional environmental data.

Burns et al. used PLS to reassess the percentage contribution of coal, seep oil, shales and rivers to the total hydrocarbon loading in Prince William Sound (PWS) and the Gulf of Alaska (GoA) [99]. Data provided from NOAA and Exxon were analyzed using selected sites as sources in order to develop signatures. These signatures were based on 40 and 136 compounds, respectively and included PAH and terpane/sterane biomarkers in the case of the Exxon data. The authors used PCA to identify how many different sources could exist and to expand the number of PLS signatures to encompass all possible sources. These were then combined to determine the relative contribution from each source and to quantify the overlap among similar signatures. Using the Exxon data, a mixed combination of coal, seep oil, eroding shales and two different river sources described 13%, 18%, 24%, 26% and 20%, respectively, of the variance in PWS and GoA data. The first river signature was very similar to that of coal, while the second one was more similar to the eroding shales. With the NOAA data, the authors observed a considerable overlap in the signatures.

In [100], the influence of soil characteristics and PAH physicochemical properties in the chemical degradability of PAHs contained in aged soil samples from several contaminated sites was investigated using PLS. The PAH-contaminated soil samples were characterised and subjected to relatively mild, slurry-phase Fenton's reaction conditions. In general, low molecular weight PAHs were more degraded than large, highly hydrophobic variants. The presence of organic matter and the specific surface area of the soil were negatively correlated with the degradation of bi- and tri-cyclic PAHs, whereas the amount of degraded organic matter correlated positively with the degradation of PAHs with five or six fused rings. This was explained because larger PAHs were released from the organic matter as it degraded.

3.3. Other pollutants

Phthalate esters were investigated in surface soils from 37 sampling sites including roadsides, parks and residential areas of Guangzhou (China) [101]. These compounds were detected in all surface soils analyzed as ubiquitous environmental contaminants. PCA was applied to reveal their distribution patterns.

Because volatile organic compounds (VOCs) play an important role in the formation of photochemical O_3 and other oxidants in the troposphere, it is crucial the characterization of their sources and distribution in the atmosphere. Different multivariate techniques such as PCA/APCA, CMB, PMF and UNMIX were applied in order to identify and to apportion the VOCs sources in rural and urban sites.

In [102], the CMB receptor model has apportioned VOCs in more than 20 urban areas, mostly in the USA. The models in these areas differ in terms of the total fraction apportioned, the calculation method, the chemical compounds used in the calculation, the apportionment units and the source profiles applied. Nevertheless, they show similar results for VOC fractions contributed by different sources. Gasoline vehicle exhaust, liquid gasoline and gasoline evaporation contribute up to 50% or more of the ambient VOCs in many of these studies. In another study, a CMB receptor model and a multivariate receptor model (UNMIX) were used for the determination of the contributions of different non-methane hydrocarbon sources in Helsinki [103]. Source contributions were estimated for different seasons of the year and weekly and diurnal variations were examined using the CMB mode. UNMIX was used to confirm that the major sources were included in the CMB calculations. According to the CMB analysis, major sources of C2–C10 hydrocarbons were traffic and emissions from distant sources. For

C6–C10 hydrocarbons, the major sources in both CMB and UNMIX analyses were gasoline exhaust.

Relationships between VOCs and transient high ozone formation in the Houston area were evaluated by Gan and Hopke [104]. Based on CMB analysis, a linear model was established between the subset of the VOCs data and the positive ozone transition. Non-negative least-squares were used to calculate the regression coefficient of the VOCs that have the most significant direct relationship to the positive ozone transition. The results show that more attention should be paid to additional non-considered VOCs, which can have significant relationship to the transient high ozone formation.

UNMIX and PMF were used to analyze ambient VOCs measured in a spring campaign in 1996 at Santiago de Chile. Two sites were sampled: a downtown site, close to major traffic emissions and a residential site, downwind of major industrial sources and highways [105]. It was found that the number of factors given by the UNMIX model was a good starting point to refine the solution using PMF. Both models showed good performance at discriminating between source profiles that had similar compositions in subsets of common species, but PMF was able to find better and cleaner source profiles than UNMIX.

Four receptor models (CMB, PCA/APCA, PMF and UNMIX) were used to describe personal exposure measurements to toxic VOCs. The measurements were from the total exposure assessment studies conducted from 1980 to 1984 in New Jersey and California and from the 1987 to 1990 California Indoor Exposure study [106]. From the four receptor models compared, PMF and UNMIX showed the closest agreement, extracting six similar factors from the New Jersey personal exposure data and four similar factors from the California data. Between the two methods, PMF has the advantage of reporting more complete information on model performance than the current version of UNMIX. The lack of a non-negativity constraint is a significant limitation of both PCA/APCA and CMB. Nevertheless, results from CMB were useful to help in the interpretation of factors extracted by the other models.

In [107], the effectiveness of using trace organic speciation data to identify sources influencing fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure concentrations was investigated. PM_{2.5} samples, with organic carbon as dominant constituent, were obtained from seven different individuals in and around Boulder, CO (USA). The data set was analyzed by PCA to determine the factors that account for the largest variance. Eight significant factors were identified and each of them was matched to a potential source according to the marker species that mostly loaded the factor. Meat cooking was an important source of variability and its associated factor was highly correlated to organic carbon concentration. The exposure time while developing an activity was generally not well correlated to the PCA factor scores because exposure time is not directly related to emissions intensity. The PCA results demonstrated that organic tracers can aid in identifying factors that influence personal exposures to PM_{2.5}.

In [108], PM_{2.5} and VOCs data collected at Beacon Hill in Seattle between 2000 and 2004 were analyzed with the Multilinear Engine method [31] in order to quantify source contributions to the mixture of hazardous air pollutants (HAPs). ME solves a positively constrained bilinear mass balance model using an explicit least-squares equation. The required input data include the mass concentrations and uncertainties of each measured species. ME is an evolution of the different PMF methods towards an improved generalized multilinear modelling tool. The authors tested the performance of the model with and without the addition of VOCs data. They also used the 'missing mass', defined as the concentration of the measured total particle mass minus the sum of all analyzed species, as an additional variable and implemented an auxiliary equation to constrain the sum of all species mass fractions to be

Table 4
QSAR studies.

Compounds	Multivariate method ^a	Aim of the multivariate method in the study	References
Pesticides			
Pesticides	BNN	Prediction of the toxicity to <i>Lepomis macrochirus</i> under varying experimental conditions	[116]
Thiazoline derivatives	PCA, GA-MLR, LS-SVM, PPR	Fungicidal activities of thiazoline derivatives against rice blast. PCA was used to build a validate training set	[117]
One hundred and sixteen pesticides	PCA, GA, SVM, LDA, KNN	Prediction of the avian oral toxicity. GA for variable selection in PCA	[118]
Pesticides	MLR, GA, SOM, AFP	Prediction of toxicity against fathead minnow. SOM (selection training)	[119]
Two hundred and thirty-five pesticides	NMC, LDA, QDA, RDA, SIMCA, KNN, CART	Critical analysis of the different models and descriptors in order to predict ecotoxicity	[120]
Phenylureas and triazines	MDS, GA (for variable selection)-MDS	Selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action	[121]
Polycyclic aromatic hydrocarbons PHAs	PLS	QSAR model to predict the phototoxicity.	[122]
Sixty-seven PAHs	GA (variable selection) KNN, CART, SOM (external validation)	QSAR model to predict mutagenicity in human cells of the pollutants	[123]
Other organic pollutants			
One hundred and twenty-five organic compounds	GA (for variable selection), PCA (<i>a priori</i> classification), KNN, CART, LDA, SLDA, RDA	Qsar models to predict toxicity on algae, <i>Daphnia</i> , and fish	[124]
Two hundred and fifty organic compounds	HCA (<i>a priori</i> classification), KNN, CART, CP-ANN	QSAR model to screen and rank POPs with regard to their tendency towards atmospheric persistence and mobility	[125]
One hundred and ninety-one organic compounds	RBF-ANNs, LDA, NLDA and SVM	Comparison of the QSAR models to predict aquatic toxicity	[126]
15 PBDEs	PLS/LOO-CV (variable selection), SVM and RBF-ANNs	QSAR models to predict the Aryl hydrocarbon Receptor Relative Binding Affinities (RBA) of pollutants	[127]

^a See acronyms in Table 1. PBDEs, polybrominated diphenyl ethers.

100%. Using only PM_{2.5} data, the model distinguished two diesel sources with the 100% constraint, but identified only one diesel source without the constraint. When both PM_{2.5} and VOCs data were used, an additional feature was identified as the major contributor to total VOC mass. Adding VOCs data to the specified PM_{2.5} data in source apportionment modelling resulted in more accurate source contribution estimates for combustion related sources, as evidenced by the less 'missing mass' percentage in PM_{2.5}. Using the source contribution estimates, the authors did also evaluate the validity of using black carbon as a surrogate for diesel exhaust during different seasons.

Non-parametric regression is also a powerful technique that has many potential uses in air quality studies and atmospheric sciences. In [109], the relationship between the concentration of cyclohexane and other VOCs with wind direction was determined at two sites near a heavy industrial region in Houston (USA), by non-parametric regression using a Gaussian kernel. The results were smooth curves with error bars that allowed for the accurate determination of the wind direction where the concentration peaks and thus, the location of nearby sources. Cyclohexane was chosen to test the method because 70% of the industrial emissions in the region are known to be from this single source. Thus, the intersection of two lines drawn from each site in the direction of the largest concentration peak should be the location of this source. The success of the method can be judged by how closely the predicted position of the source corresponds to the known location. The non-parametric regression correctly identified the direction of this source from each site and the predicted location of the source was less than 500 m away from that given in the inventory.

Among the persistent organic pollutants targeted for monitoring, control and virtual elimination by international research

projects and agreements (UNEP, 2001), polychlorinated biphenyls (PCBs) are ubiquitous contaminants in the environment. Polytopic vector analysis (PVA) has been used for the characterization of sources and alteration patterns of PCBs in complex environmental settings. As an example, in [110] the authors discussed PCB dechlorination processes measured in Lake Hartwell sediments using a PVA receptor model. The GC-MS resolution of 107 PCB congeners provided insight into PCB sources and the degree of PCB weathering in the sediments. Modifications in congener concentrations and typology were characterized by comparing surface sediment congener distributions with the distributions in buried sediments and were matched with literature-reported dechlorination patterns from other sites. PVA results were used to determine PCB sources and dechlorination end member (EM) patterns and their distributions in each of the cores. The authors showed the advantage of such an approach to identify fingerprints (EMs) with minimal assumption of contributing source patterns and/or alteration mechanisms.

The usefulness of the combination of the probabilistic model called potential source contribution function (PSCF) with PMF was proposed as a tool to identify atmospheric PCB sources regions in Philadelphia [111]. PSCF can only reveal the potential source location, but cannot give a quantitative indication of the source strength. Thus, the combination with PMF can provide an effective tool for identification of atmosphere source and apportionment.

Results of three hybrid receptor models, PSCF, concentration weighted trajectory (CWT) and residence time weighted concentration (RTWC), were compared for locating PCB sources contributing to the atmospheric concentrations in Chicago [112]. All three trajectories ensemble models consistently indicated similar PCB source locations. Each approach was found to have some advantages com-

pared to the others. Thus, when used together, they provide better information on source areas than the obtained by using only one of them.

Chemometric assessment of multivariate data sets generated in monitoring studies of other pollutant compounds, such as PBDEs, non-ionic surfactants and linear alkylbenzene sulfonates have also been done. As an example, identification, resolution and distribution of main microcontaminant sources of endocrine disruptors in Spanish harbours, coastal waters and sediments were investigated using PCA and MCR-ALS [113]. In this study, the authors interpreted the main environmental contamination sources of these endocrine disruptor compounds according to their chemical composition and to their resolved geographical distribution profiles. Whereas PCA allowed the qualitative interpretation of the major contamination sources, MCR-ALS confirmed these results and allowed a semi-quantitative view of contamination sources allowing their apportionment. Although 'hot spots' with point sources of municipal and industrial discharges were identified, it could be concluded that the investigated compounds were widespread contaminants in the marine environment of the Mediterranean Spanish coasts and harbours. Large accumulation effects of most of these contaminants were observed for sediment samples collected near discharges of domestic or industrial wastewaters in the studied harbour areas, as compared with less contaminated sea water samples.

4. Toxicity studies

4.1. Pesticides

As can be seen in Table 4, many pesticide toxicity studies have been conducted using ANN, which is appropriate in cases of highly non-linear relationships between the input and output variables. Several QSAR models have been developed to predict the aquatic toxicity of pesticides using ANNs. An example of these QSAR studies can be found in [116], where the estimation of the acute toxicity of pesticides against *Lepomis macrochirus* (freshwater fish) under different experimental and biological conditions (e.g., fish weight, exposure time, temperature, pH and water hardness) was done using a three-layer feed-forward neural network trained by the back-propagation algorithm.

However, ANNs may tend to overfit the training data set unless very careful external validation strategies are applied that will ensure reliable prediction models. Alternatively, genetic algorithm-multilinear regression (GA-MLR), least-squares support vector machine (LS-SVM), which performs classification tasks by constructing hyperplanes in a multi-dimensional space to separate cases of different class labels) and projection pursuit regression (PPR, which involves finding the most 'interesting' projections in multi-dimensional data, i.e., those which deviate more from a normal distribution) have been proposed to model the fungicidal activity of thiazoline against rice blast [117]. The GA-MLR method was used to select the most appropriate molecular descriptors from the large original set to develop a linear quantitative structure–activity relationship (QSAR) model. On the basis of the selected descriptors, two more accurate models (LS-SVM and PPR) were built. Both the linear and non-linear models gave satisfactory prediction results, but the non-linear models provided better prediction ability, which means that LS-SVM and PPR methods could simulate more adequately the real relationship between the structural descriptors and the fungicidal activity.

Mazzatorta et al. also demonstrated the ability of SVM combined with GA for feature selection and prediction of the avian oral toxicity of 116 pesticides [118]. A comparison with several other classification methods was performed.

A QSAR model to predict the toxicity of pesticides against fat-head minnow (freshwater fish) was built by Pintore et al. [119]. In their work, the authors combined genetic algorithms and stepwise regression methods in order to select the best descriptors for the model. GA is very effective for exploratory search, applicable to problems where little information is available, but it is less appropriate for a local search. Then, a stepwise approach was combined with GA (GA/SW) in order to reach local convergence. The selection of the training set was performed by SOM, which provided a 2D-space representation of molecular descriptors obtained from the original multi-dimensional space. Finally, a QSAR model was built by the adaptive fuzzy partition (AFP) method. This consists of modelling the relationship between molecular descriptors and biological activities of pesticides by dynamically dividing the molecular descriptor hyperspace into new fuzzy subspaces. Several models were attempted for the study, classification and prediction of toxicities of 253 pesticides. Seven classification algorithms were used and compared in detail and the performance of the different models was assessed [120]. The methods used were nearest mean classifier (NMC), LDA, quadratic discriminant analysis (QDA), regularized discriminant analysis (RDA), SIMCA, KNN and classification and regression tree (CART). The first four are parametric statistical systems based on Fisher's discriminant analysis, the fifth and sixth are non-parametric statistical methods and the last is a classification tree. CART and RDA appeared to be the classification algorithms which best described the biological activities of the pesticides considered. RDA had a further advantage: because of the definition of RDA, the classification is easier to understand. The regularization was used to overcome the problems of linear and quadratic discriminant analysis.

Gramatica et al. proposed a new approach for the selection of chemicals with similar mode of action, based on the analysis of structural similarities by means of QSAR and chemometric methods (PCA, multi-dimensional scaling (MDS) and GA) [121]. PCA and MDS were used for data exploration. MDS gave the best two-dimensional projection able to approximate the whole set of the Euclidean distances among the compounds. GA was used as variable selection method. The proposed approach seems to be a very promising tool, even if the available information is too scarce to fully understand the precise role of the different molecular descriptors in explaining the toxicological behaviour of the investigated pesticides.

4.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons

The increasing concern about the input of PAHs in the environment has stimulated the investigation of their properties and biological activities, mainly because of their carcinogenic and toxic potential. PAHs containing four or more condensed rings are particularly hazardous because most of them are carcinogenic, mutagenic and extremely resistant to enzymatic degradation. Recent research has demonstrated that the toxic effect of chemicals can be induced or enhanced by visible or UV radiation. The photocytotoxicity and mutagenic and carcinogenic activity have been studied in a number of aquatic organisms. However, these QSAR models were usually developed using MLR, which will not be reviewed in this paper.

Alves de Lima Ribeiro et al. proposed a QSAR model to predict the phototoxicity of PAHs using electronic descriptors and PLS [122]. The relationship between these molecular descriptors and the photoinduced toxicity is non-linear and Gaussian type functions were used to linearize them. Once the model was validated, the phototoxicity was predicted for a set of molecules in which experimental measurements were unknown. Among them, pentaphene, benzo[*b*]chrysene and dibenz[*a,j*]anthracene are the compounds potentially phototoxic as predicted by the model.

In [123], experimental data of a mutagenicity test on human B-lymphoblastoid cells (alternative to the Ames bacterial test) for a

set of 70 oxo-, nitro- and unsubstituted PAHs detected in particulate matter (PM), were modelled by QSAR classification methods (KNN and CART) based on different theoretical molecular descriptors selected by genetic algorithms. The best models were internally and externally validated for prediction. For external validation, SOM was applied to split the original data set. The best models, developed on the training set alone, also showed good predictive performance on the prediction set of chemicals. The classification of PAHs according to their mutagenicity, based only on a few theoretical molecular descriptors, allowed a preliminary assessment of the human health risk and the prioritization of these compounds.

4.3. Other pollutants

As previously stated, there is a need for predictive tools capable to perform a preliminary hazard ranking for the very large number of existing chemicals discharged into the environment and for which experimental data are insufficient. In [124], QSAR models were developed in order to produce additional toxicological data for unmeasured compounds. The QSAR models to predict aquatic toxicity (algae, *Daphnia* and fish) of 125 organic compounds were performed based on: (1) the use of a large set of traditional and non-traditional molecular descriptors, (2) the selection of molecular descriptors by a genetic algorithm and (3) the production of models by ordinary least-squares regression. This approach was proven to be suitable to build models with satisfactory predictive capability, even on a largely heterogeneous data set. Afterwards, the data set was analyzed by PCA to rank chemicals as a function of their toxicity on different representative aquatic organisms and to help in the definition of *a priori* classes of toxicity. Finally, several classification methods (CART, KNN, RDA and LDA) were applied in order to classify the hazard of chemicals for the aquatic environment as a function of their molecular structure. The authors emphasized that different classification models may produce, in some cases, different evaluations. Thus, the best way to obtain reliable results is the combined use of several classification models, taking as starting point the *a priori* classes suggested by the PCA results of toxicity data.

In [125], a quantitative structure–property relationship (QSPR) study for the prediction of the environmental persistence of a set of 250 heterogeneous organic compounds was presented. Three *a priori* defined classes of environmental persistence were suggested by HCA, from the analysis of half-life data in air, water, soil and sediment and three interpretable theoretical molecular descriptors for all the studied compounds. QSPR classification models were successfully developed using different techniques, such as KNN, CART and counter propagation-ANN (CP-ANN), which is an adaptation of the Kohonen network to solve supervised problems. The models obtained for the prediction of potential persistence of heterogeneous organic compounds could be potentially useful as preliminary tools for the identification and prioritization of new potential POPs among already existing chemicals. A step forward would be their use as ‘screening prior to synthesis’ procedures to prevent the production and consequent release into the environment of potential POPs. Among the three presented strategies, the CP-ANN model gave the best results and was robust and accurate in the classification task for the three classes of persistence level. The CART model gave the most unbalanced results among the three classes, but they were still satisfactory. However, the simplicity of this approach is a good point when CART is compared with the other classification techniques presented in this study.

The performance and predictive capability of SVM and RBF-ANNs for classification problems in QSAR/QSPR were investigated and compared with several other classification methods, such as LDA and non-linear DA (NLDA). In [126], two different data sets are evaluated. The first one involves the classification of four action

modes of 221 phenols and the second deals with the classification of three narcosis mechanisms of aquatic toxicity for 194 organic compounds. In both cases, the predictive ability of the SVM model is comparable or better than those obtained by LDA, NLDA and RBF-ANNs. The results obtained indicate that the SVM model with the RBF kernel function can be used as an alternative tool for classification problems in QSAR/QSPR. In another study [127], PLS was used to extract the seven best descriptors from more than 80 quantum descriptors in order to predict the aryl hydrocarbon receptor relative binding affinities of PBDEs. The extracted seven descriptors were correlated with the relative binding affinities of 15 PBDE congeners using SVM and RBF-ANNs. SVM models were proven to be of more general applicability than the RBF-ANNs models.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), Project A/8964/07, Universidad Nacional de Rosario, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Project PAE 22204) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina, Project PIP No. 1950), for financial support of this work.

References

- [1] <http://www.epa.gov/ebtpages/pollutants.html>.
- [2] S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 161.
- [3] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Talanta 70 (2006) 678.
- [4] A. Salinas Castillo, A. Segura Carretero, J.M. Costa, Anal. Chim. Acta 516 (2004) 213.
- [5] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J.S. Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, Parts A and B.
- [6] R. Bro, Anal. Chim. Acta 500 (2003) 185.
- [7] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, Anal. Chem. 66 (1994) 782A.
- [8] A.C. Olivieri, Anal. Chem. 80 (2008) 5713.
- [9] G.M. Escandar, N.M. Faber, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, R.J. Poppi, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 752.
- [10] R. Tauler, A. Smilde, B.R. Kowalski, J. Chemometrics 9 (1995) 31.
- [11] A. de Juan, E. Casassas, R. Tauler, in: R.A. Myers (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, vol. 11, Wiley, Chichester, West Sussex, UK, 2002, pp. 9800–9837.
- [12] R. Bro, Chemom. Intell. Lab. Syst. 38 (1997) 149.
- [13] D. Bohoyo Gil, A. Muñoz de la Peña, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, A.C. Olivieri, Anal. Chem. 78 (2006) 8051.
- [14] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, Analyst 131 (2006) 1012.
- [15] J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Anal. Chim. Acta 584 (2007) 287.
- [16] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Anal. Chem. 80 (2008) 8276.
- [17] P.K. Hopke, J. Chemometrics 17 (2003) 225.
- [18] R.C. Henry, C.W. Lewis, P.K. Hopke, H.J. Williamson, Atmos. Environ. 18 (1984) 1507.
- [19] P.K. Hopke, Receptor Modeling in Environmental Chemistry, Wiley, New York, 1985.
- [20] J. Einax, H. Zwaniger, S. Geiss (Eds.), Chemometrics in Environmental Analysis, VCH, Weinheim, Germany, 1997.
- [21] I.T. Jolliffe, Principal Component Analysis, Springer, New York, USA, 1986.
- [22] G.D. Thurston, D. Spengler, Atmos. Environ. 19 (1985) 9.
- [23] E. Peré-Trepát, L. Olivella, A. Ginebreda, J. Calach, R. Tauler, Sci. Total Environ. 371 (2006) 223.
- [24] P. Paatero, P.K. Hopke, X.-H. Song, Z. Ramadan, Chemom. Intell. Lab. Syst. 60 (2002) 253.
- [25] R.C. Henry, Chemom. Intell. Lab. Syst. 65 (2003) 179.
- [26] P. Paatero, U. Tapper, Environmetrics 5 (1994) 111.
- [27] J.S. Salau, R. Tauler, J.M. Bayona, I. Tolosa, Environ. Sci. Technol. 31 (1997) 3482.
- [28] R. Tauler, D. Barceló, E.M. Thurman, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 3307.
- [29] R. Tauler, M. Viana, X. Querol, A. Alastueya, R.M. Flight, P.D. Wentzell, P.K. Hopke, Atmos. Environ. 43 (2009) 3989.
- [30] L.R. Tucker, Psychometrika 31 (1966) 279.
- [31] P. Paatero, J. Comput. Graph. Stat. 8 (1999) 854.
- [32] A. de Juan, R. Tauler, J. Chemometrics 15 (2001) 749.
- [33] E. Peré-Trepát, A. Ginebreda, R. Tauler, Chemom. Intell. Lab. Syst. 88 (2007) 69.
- [34] L. Eriksson, J. Jaworska, A.P. Worth, M.T.D. Cronin, R.M. McDowell, P. Gramatica, Chemom. Intell. Lab. Syst. 34 (1996) 1.
- [35] S. Weisberg, Applied Linear Regression, John Wiley & Sons, New York, USA, 1985.

- [36] D.E. Goldberg, Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning, Addison-Wesley, New York, USA, 1989.
- [37] S. Haykin, Neural Networks. A Comprehensive Foundation, 2nd ed., Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 1999.
- [38] R. Schalkoff, Pattern Recognition Statistical, Structural and Neural Approaches, John Wiley & Sons, New York, USA, 1992.
- [39] I.M. Farnham, A.K. Singh, K.J. Stetzenbach, K.H. Lohannesson, Chemom. Intell. Lab. Syst. 60 (2002) 265.
- [40] M. Daszykowski, B. Walczak, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 1081.
- [41] G.T. Miller, Sustaining the Earth, 6th ed., Thompson Learning Inc. Pacific Grove, California, USA, 2004, Ch 9, pp. 211–216.
- [42] T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 716.
- [43] A. Smilde, R. Bro, P. Geladi, Multi-way Analysis with Applications in the Chemical Sciences, Wiley, Chichester, UK, 2004.
- [44] A. Guiberteau-Cabanillas, T. Galeano-Díaz, N. Mora, F. Salinas, J.M. Ortíz, J.C. Viré, Comp. Chem. 25 (2001) 459.
- [45] Y. Ni, D. Cao, S. Kokot, Anal. Chim. Acta 588 (2007) 131.
- [46] D. Brunet, T. Woignier, M. Lesueur-Jannoyer, R. Achard, L. Rangon, B.G. Barthès, Environ. Pollut. 157 (2009) 3120.
- [47] Y. Ni, W. Xiao, S. Kokot, J. Hazard. Mater. 168 (2009) 1239.
- [48] E. Comas, R.A. Gimeno, J. Ferré, R.M. Marcé, F. Borrull, F.X. Rius, J. Chromatogr. A 1035 (2004) 195.
- [49] E. Peré-Trepát, A. Hildebrandt, D. Barceló, S. Lacorte, R. Tauler, Chemom. Intell. Lab. Syst. 74 (2004) 293.
- [50] E. Peré-Trepát, S. Lacorte, R. Tauler, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 111.
- [51] E. Peré-Trepát, R. Tauler, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 85.
- [52] E. Peré-Trepát, S. Lacorte, R. Tauler, Anal. Chim. Acta 595 (2007) 228.
- [53] T. Khayamian, G.H. Tan, A. Sirhan, Y.F. Siew, S.M. Sajjadi, Chemom. Intell. Lab. Syst. 96 (2009) 149.
- [54] E. Bezemer, S. Rutan, Anal. Chim. Acta 459 (2002) 277.
- [55] J. Saurina, C. Leal, R. Compañón, M. Granados, R. Tauler, M.D. Prat, Anal. Chim. Acta 409 (2000) 237.
- [56] M.J. Rodríguez Cuesta, R. Boqué, F.X. Rius, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, A. Garrido French, Anal. Chim. Acta 491 (2003) 47.
- [57] A. Garrido French, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, J.L. Martínez Vidal, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 974.
- [58] M.L. Nahorniak, K.S. Booksh, Y.C. Kim, K.S. Booksh, Analyst 130 (2005) 85.
- [59] S.H. Zhu, H.L. Wu, A.L. Xia, J.F. Nie, Y.C. Bian, C.B. Cai, R.Q. Yu, Talanta 77 (2009) 1640.
- [60] T. Galeano-Díaz, A. Guiberteau-Cabanillas, A. Espinosa-Mansilla, M.D. López-Soto, Anal. Chim. Acta 618 (2008) 131.
- [61] O. Devos, B. Fangeat, A.L. Sabat, L. Patruel, E. Naffrechoux, J. Jarosz, Anal. Chem. 74 (2002) 678.
- [62] T.J. Grundl, J.H. Aldstadt, J.G. Harb, R.W. St. Germain, R.C. Schweitzer, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 1189.
- [63] M.L. Nahorniak, K.S. Booksh, J. Chemometrics 17 (2003) 608.
- [64] Y.C. Kim, J.A. Jordan, M.L. Nahorniak, K.S. Booksh, Anal. Chem. 77 (2005) 7679.
- [65] R.A. Gimeno, E. Comas, R.M. Marcé, J. Ferré, F.X. Rius, F. Borrull, Anal. Chim. Acta 498 (2003) 47.
- [66] P.D. Wentzell, S.S. Nair, R.D. Guy, Anal. Chem. 73 (2001) 1408.
- [67] M.V. Bosco, M.S. Larrech, Talanta 71 (2007) 1703.
- [68] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Anal. Chem. 81 (2009) 8074.
- [69] Ch. Coury, A.M. Dillner, Atmos. Environ. 42 (2008) 5923.
- [70] J.M. Gutiérrez, A. Gutiérrez, F. Céspedes, M. del Valle, R. Muñoz, Talanta 76 (2008) 373.
- [71] A.E. Sinha, C.G. Fraga, B.J. Prazen, R.E. Synovec, J. Chromatogr. A 1027 (2004) 269.
- [72] H.C. Goicoechea, S. Yu, A.C. Olivieri, A.D. Campiglia, Anal. Chem. 77 (2005) 2608.
- [73] R. SantiagoValverde, M.D. GilGarcía, M. MartínezGalera, H.C. Goicoechea, Talanta 70 (2006) 774.
- [74] M.M. de Zan, M.D. GilGarcía, M.J. Culzoni, R.G. Siano, H.C. Goicoechea, M. MartínezGalera, J. Chromatogr. A 1179 (2008) 115.
- [75] K.P. Singh, N. Basant, A. Malik, V.K. Singh, D. Mohan, Anal. Chim. Acta 630 (2008) 10.
- [76] A. ValeroNavarro, P.C. Damiani, J.F. FernándezSánchez, A. SeguraCarretero, A. FernándezGutiérrez, Talanta 78 (2009) 57.
- [77] S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler, Anal. Chim. Acta 618 (2008) 18.
- [78] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, Chemom. Intell. Lab. Syst. 54 (2000) 123.
- [79] A. Navarro, R. Tauler, S. Lacorte, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 1020.
- [80] C.M. Gonçalves, J.C.G. Esteves da Silva, M.F. Alpendurada, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 6227.
- [81] R. Tauler, S. Lacorte, M. Guillaumon, R. Céspedes, P. Viana, D. Barceló, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 565.
- [82] M. Terrado, M. Kuster, D. Ralldá, M. Lopez de Alda, D. Barceló, R. Tauler, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1479.
- [83] J. Li, G. Zhang, S. Qi, X. Li, X. Peng, Sci. Total Environ. 372 (2006) 215.
- [84] G.B. Sahoo, C. Ray, H.F. Wade, Ecol. Modell. 183 (2005) 29.
- [85] M. Felipe-Sotelo, R. Tauler, I. Vives, J.O. Grimalt, Sci. Total Environ. 404 (2008) 148.
- [86] K. Lundstedt-Enkel, L. Asplund, K. Nylund, A. Bignert, M. Tysklind, M. Olsson, J. Örborg, Chemosphere 65 (2006) 1591.
- [87] J. Damásio, R. Tauler, E. Teixidó, M. Rieradevall, N. Prat, M.C. Riva, A. Soares, C. Barata, Aquat. Toxicol. 87 (2008) 310.
- [88] D.D. Golobocanin, B.D. Skrbic, N.R. Miljevic, Chemom. Intell. Lab. Syst. 72 (2004) 219.
- [89] J. Braga Dallarosa, E. Calesso Teixeira, M. Pires, J. Fachel, Atmos. Environ. 39 (2005) 6587.
- [90] L. Wang, Z. Yang, J. Niu, J. Wang, J. Hazard. Mater. 169 (2009) 460.
- [91] L. Gaspere, J.F. Machiwa, S.J.M. Mdachi, G. Streck, W. Brack, Environ. Pollut. 157 (2009) 24.
- [92] A. Li, J.K. Jang, P.A. Scheff, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 2958.
- [93] P. Bzdusek, E. Christensen, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 97.
- [94] K.P. Singh, A. Malik, R. Kumar, P. Saxena, S. Sinha, Environ. Monit. Assess. 136 (2008) 183.
- [95] R.C. Brändli, T.D. Bucheli, S. Ammann, P.D. Boehm, A. Desauls, E. Keller, F. Blum, W.A. Stahel, J. Environ. Monit. 10 (2008) 1278.
- [96] U. Sofowotw, B. McCarty, C. Marvin, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 6007.
- [97] R.K. Larsen, J.E. Baker, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 1873.
- [98] M. Wesolowski, B. Suchacz, J. Halkiewicz, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 458.
- [99] W.A. Burns, S.M. Mudge, A.E. Bence, P.D. Boehm, J.S. Brown, D.S. Page, K.R. Parker, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 6561.
- [100] S. Jonsson, Y. Persson, S. Frankki, B. van Bavel, S. Lundstedt, P. Haglund, M. Tysklind, J. Hazard. Mater. 149 (2007) 86.
- [101] F. Zeng, K. Cui, Z. Xie, L. Wu, D. Luo, L. Chen, Y. Lin, M. Liu, G. Sun, J. Hazard. Mater. 164 (2009) 1171.
- [102] J.G. Watson, J.C. Chow, E.M. Fujita, Atmos. Environ. 35 (2001) 1567.
- [103] H. Hellén, H. Hakola, T. Laurila, Atmos. Environ. 37 (2003) 1413.
- [104] F. Gan, P.K. Hopke, Anal. Chim. Acta 490 (2003) 153.
- [105] H. Jorquera, B. Rappenglück, Atmos. Environ. 38 (2004) 4243.
- [106] M.J. Anderson, E.P. Daly, S.L. Miller, J.B. Milford, Atmos. Environ. 36 (2002) 3643.
- [107] G.L. Brinkman, J.B. Milford, J.J. Schauer, M.M. Shafer, M.P. Hannigan, Atmos. Environ. 43 (2009) 1972.
- [108] C.F. Wu, T.V. Larson, S. Wu, J. Williamson, H.H. Westberg, L.-J.S. Liu, Sci. Total Environ. 386 (2007) 42.
- [109] R.C. Henry, Y.S. Chang, C.H. Spiegelman, Atmos. Environ. 36 (2002) 2237.
- [110] V.S. Magar, G.W. Johnson, R.C. Brenner, J.F. Quensen, E.A. Foote, G. Durell, J.A. Ickes, C. Peven-McCarthy, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 3538.
- [111] S. Du, L.A. Rodenburg, Atmos. Environ. 41 (2007) 8596.
- [112] Y.-K. Hsua, T.M. Holsena, P.K. Hopke, Atmos. Environ. 37 (2003) 545.
- [113] E. Peré-Trepát, M. Petrovic, D. Barceló, R. Tauler, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 642.
- [114] R. Tauler, I. Marques, E. Casassas, J. Chemometrics 12 (1998) 55.
- [115] P.K. Hopke, A guide to positive matrix factorisation, 2009, <http://www.epa.gov/ttn/amtic/files/ambient/pm25/workshop/laymen.pdf>.
- [116] J. Devillers, SAR QSAR Environ. Res. 11 (2001) 397.
- [117] H. Du, J. Wang, Z. Hu, X. Yao, X. Zhang, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 10785.
- [118] P. Mazzatorta, M.T.D. Cronin, E. Benfenati, QSAR Comb. Sci. 25 (2006) 616.
- [119] M. Pintore, N. Piclin, E. Benfenati, G. Gini, J.R. Chrétien, QSAR Comb. Sci. 22 (2003) 210.
- [120] P. Mazzatorta, E. Benfenati, P. Lorenzini, M. Vighi, J. Chem. Inform. Comput. Sci. 44 (2004) 105.
- [121] P. Gramatica, M. Vighi, F. Consolaro, R. Todeschini, A. Finizio, M. Faust, Chemosphere 42 (2001) 873.
- [122] F. Alves de Lima Ribeiro, M.C. Ferreira, J. Mol. Struct. THEOCHEM 719 (2005) 191.
- [123] E. Papa, P. Pilutti, P. Gramatica, SAR QSAR Environ. Res. 19 (2008) 115.
- [124] M. Vighi, P. Gramatica, F. Consolaro, R. Todeschini, Ecotox. Environ. Safety 49 (2001) 206.
- [125] E. Papa, P. Gramatica, J. Mol. Graph. Model. 27 (2008) 59.
- [126] X.J. Yao, A. Panaye, J.P. Doucet, H.F. Chen, R.S. Zhang, B.T. Fan, M.C. Liu, Z.D. Hu, Anal. Chim. Acta 535 (2005) 259.
- [127] G. Zheng, M. Xiao, X. Lu, QSAR Comb. Sci. 26 (2007) 536.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes

Sílvia Mas^{a,b,*}, Romà Tauler^b, Anna de Juan^a

^a Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18, Barcelona, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2011
Received in revised form
30 September 2011
Accepted 14 October 2011
Available online 25 October 2011

Keywords:

Photodegradation
Process analysis
Process chromatography
Soft-modeling multivariate curve
resolution (MCR-ALS)
Hybrid hard- and soft-modeling (HS-MCR)
Data fusion

ABSTRACT

Photodegradation processes are of high relevance in environmental and pharmaceutical contexts, since the fate and identity of photoproducts are often linked to contamination or toxicology issues. The aim of this work is proposing a new general methodology to monitor and interpret photodegradation processes based on chromatographic and spectroscopic measurements and data fusion analysis. The new approach relies on two steps: (a) data fusion of HPLC–DAD–MS runs coming from process monitoring and analysis by soft-modeling multivariate curve resolution (MCR) to achieve the identification of photoproducts and a first insight on their kinetic behavior; and (b) data fusion of UV–vis spectroscopic monitoring data with HPLC–DAD process runs and analysis by hybrid hard- and soft-modeling MCR (HS-MCR) to complete the description of the kinetic mechanism of the process and to provide the related rate constants. These data fusions overcome limitations of previous approaches and have never been reported in real examples of process analysis. The ketoprofen photodegradation has been selected as the real case study to illustrate the possibilities of the described approach. In this particular case, a comprehensive description of the kinetics linked to the photochemical degradation of the ketoprofen, with all successive steps, related rate constants and photoproducts formed has been proposed. Four photodegradation products (3-(1-hydroperoxyethyl)benzophenone, 3-acetylbenzophenone, 3-(1-hydroxyethyl)benzophenone and 3-ethylbenzophenone) could be resolved as a result of the decarboxylation of ketoprofen under UV light and the photodegradation process could be described with a kinetic model including parallel and consecutive reactions.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photodegradation processes are ubiquitous in nature and are highly relevant in environmental and pharmaceutical areas. A comprehensive description of a photodegradation process involves identifying the photoproducts formed and elucidating the mechanism governing the process. Both aspects are equally important, since the nature of the photoproducts is linked to contaminant or toxicological properties and the mechanism of the process describes the fate of these products and their persistence once formed.

Spectroscopic and chromatographic methods have been extensively used to monitor photodegradation processes [1,2]. Often, spectroscopic monitoring has been more focused onto the mech-

anistic description of the process, whereas chromatographic monitoring has been more devoted to the identification of the photoproducts formed. To handle the complexity of these experimental measurements, the use of multivariate analysis tools has become mandatory. Process analysis can be mainly approached by using hard-modeling and soft-modeling methods. Hard-modeling methods work by fitting a mechanistic parametric model to the variation of the experimental data [3], whereas soft-modeling methods are data-driven approaches, which rely on the variation of the measured data to describe the evolution of the system under study [5]. Hybrid methods combining hard- and soft-modeling aspects are available to overcome limitations linked to the parent methodologies [6,7].

The two experimental/data analysis combinations most used in process analysis are: spectroscopic monitoring and hard-modeling methods [4,8] and chromatographic monitoring and soft-modeling tools [9–11]. When spectroscopic monitoring and hard-modeling analysis are used, the experimental data provide a well defined time axis and the possibility to fit a specific kinetic model and to obtain the related rate constants. As additional information, the

* Corresponding author at: Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 403 44 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: silviamas@ub.edu (S. Mas).

pure spectra of the compounds involved in the process are obtained. The use of hard-modeling requires full knowledge of the reaction mechanism. When this knowledge is insufficient or spurious contributions to the measured signal exist, hard-modeling methods fail [6]. Additionally, species involved in the kinetic process with identical or correlated behavior cannot be modeled separately (rank-deficiency phenomenon) [12,13]. When this situation occurs, the kinetic model fitted can still be valid, but no separate spectral information on the compounds involved can be recovered [4].

Chromatographic monitoring and soft-modeling methods have been extensively applied to identify process products and to get a first insight of their kinetic evolution [9–11]. Compounds with an identical kinetic evolution or with very similar spectra can be distinguished due to their different elution behavior. Soft-modeling multivariate curve resolution (MCR) is able to resolve elution profiles and pure responses linked to the chromatographic data runs collected during a process, providing the contributions from all compounds in the samples [14–16]. This procedure allows the identification of the products formed during the process (especially, if MS detection is used) and provides a preliminary description of the kinetic evolution of the compounds involved in the process from the evolution of their peak areas as a function of the process time [9–11]. Hybrid hard- and soft-modeling approaches have also appeared that fit the evolution of the peak areas with time to a kinetic model during the chromatographic data analysis [17]. However, chromatographic process monitoring is generally limited by the poor process time axis used (i.e., the limited number of process chromatographic runs) as compared with spectroscopic monitoring approaches.

The aim of this work is proposing new data fusion structures and related analysis tools that improve the capability to identify the photoproducts formed and the accuracy in the description of the mechanism driving the photodegradation process. For this purpose, two types of data fusion are proposed:

- (a) Data fusion of process HPLC-DAD-MS chromatographic runs and analysis by multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). MCR-ALS is used to resolve the chromatographic elution profiles and pure spectra of the photodegradation products [9,15]. This allows proposing the chemical structure of the main photoproducts (from MS resolved spectra) and providing a preliminary picture of their kinetic evolution. The combined information from both DAD and MS signal detectors improves the capacity to differentiate among compounds and improves the overall signal-to-noise ratio as compared with those obtained using only one of detection system [18]. This kind of data fusion has only been used for analytical determination problems [18] and the potential usefulness of it for process analysis has only been reported with simulated data [19].
- (b) Data fusion of UV-vis spectroscopic monitoring data and HPLC-DAD data and analysis by hybrid hard- and soft-modeling. The fusion between spectroscopic and chromatographic data allows: (1) overcoming the rank-deficiency phenomenon linked to the spectroscopic monitoring experiments [10,11] by the inclusion of the chromatographic information and, (2) obtaining a much better description of the kinetic evolution of the process because of the high resolution time axis of the spectroscopic experiment. Hybrid hard- and soft-modeling MCR-ALS (HS-MCR), which includes a hard-modeling constraint, plays a crucial role in this data analysis, since it allows soft-modeling of the chromatographic information and kinetic fitting of the spectroscopic experiment. HS-MCR has been successfully applied to analyze kinetic processes in the presence of interferences [20–22] and model-based and model-free multi-set structures [23,24]. However, HS-MCR is proposed for the

first time to deal with chromatographic/spectroscopic fused data.

The great potential of these two new data fusion approaches for the comprehensive description of photodegradation processes is shown on the real example of the ketoprofen [2-(3-benzoylphenyl) propanoic acid] photodegradation, a nonsteroidal antiinflammatory drug.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

Ketoprofen (98–99% purity, Sigma-Aldrich) was used without further purification. Ammonium acetate (a.r.), acetonitrile and methanol (HPLC-grade) were from Merck. Ammonia (a.r.) was from Panreac Quimica SA. Purified water with a conductivity $<0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$ was obtained using a MilliQ water purification system (Millipore). HPLC-grade water (Chromasolv[®], Sigma-Aldrich, Germany).

Stock solution of ketoprofen was prepared in mobile phase by dilution of the liquid reagent to a concentration of $8 \times 10^{-4} \text{ M}$. Working solution was diluted to $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$. The mobile phase consists of a mixture of 80% methanol and 20% aqueous 20 mM ammonia/ammonium acetate buffer adjusted at pH 7.4 [25]. The solutions were stored in darkness and were used the same day of their preparation.

2.2. Apparatus

The photodegradation of ketoprofen was induced using a 15 W low-pressure mercury vapour lamp (Heraeus Noblelight, Germany), emitting light predominantly at 254 nm.

Spectrophotometric measurements were performed using an Agilent 8453 Diode Array spectrophotometer (G1103A), controlled by a computer to set up instrumental parameters and to perform data acquisition during spectroscopic process monitoring (UV-Visible Chemstation).

The chromatographic setup consisted of a High Performance Liquid Chromatography unit (Waters 2690 series, Milford, MA) connected in tandem with a UV-Visible diode array detector (DAD, Waters 9960 series) and a benchtop triple quadrupole mass spectrometry detector (MS, Quattro LC, Micromass, Manchester, UK).

The column used was an Atlantis[®] T3 C₁₈ (Waters, Ireland) 150 mm \times 2.1 mm, i.d. 3.5 μm . 10 μL sample volume were injected and the mobile phase flow was set at 0.250 mL/min with isocratic elution throughout the analysis.

The diode array detector was operating in the UV-vis range from 228 to 398 nm with a spectral resolution of 1.2 nm. The sampling rate was 1 spectrum/s. The mass spectrometry detector had a positive electrospray ionization source (+ESI). The +ESI conditions were: 3.0 kV capillary voltage, 15 V cone voltage, 120 and 200 °C source and desolvation temperatures, respectively, 25 L/h of nitrogen (99.999% purity) flow for the cone gas and 621 L/h for the desolvation gas. The MS detection was performed in scan mode with an m/z range from 170 to 350, a scan duration of 1 s/scan and an interscan delay of 0.1 s. The whole chromatographic setup was connected to the computer and the software MassLynx V4.0 was used to setup chromatographic conditions and to perform the data acquisition.

pH measurements of the mobile phase were performed with a pH 510 potentiometer (XS Instruments, OptoLab, Milan, Italy) with a combined pH electrode with a precision of ± 0.01 pH units.

2.3. Experimental procedure

2.3.1. Spectroscopic monitoring experiments

Ketoprofen solutions were exposed to UV light and UV–vis spectra were collected every 2 s throughout the total duration of the experiment (120 s). The first spectrum was recorded as soon as the UV lamp was switched on.

2.3.2. Chromatographic monitoring experiments

The ketoprofen solution was placed in a quartz vial and was irradiated by the UV lamp. Seven aliquots were collected from the vial at different times during the photodegradation experiment (0, 10, 20, 30, 50, 60 and 120 s) and placed in amber vials immediately after collection for analysis in the chromatographic system. A blank run was also obtained.

3. Data analysis

3.1. Data structure

A spectroscopic monitoring experiment provides a matrix **D** where the rows are spectra collected at different process times and the columns are kinetic traces at different wavelengths. The **D** matrix obeys the bilinear model in Eq. (1).

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

where **C** is the matrix of kinetic profiles of the process compounds, **S^T** contains their related pure spectra and **E** is the residual matrix with the unmodeled data variance.

Chromatographic process monitoring provides a series of chromatographic runs, each of them related to a particular process time. A single chromatographic run contains in its rows the UV–vis or MS spectra recorded at the different elution times and in its columns the chromatograms related to different wavelengths or different *m/z* values. This data set obeys the model in Eq. (1), where **C** are the elution profiles and **S^T** the related pure spectra.

The two data fusions proposed in this work require building the following multiset structures: (a) a row- and column-wise augmented matrix with all the HPLC–DAD–MS process runs and (b) a column-wise augmented matrix with the UV–vis spectroscopic monitoring experiment and the HPLC–DAD process runs. These augmented data sets are shown in Fig. 1a and b, respectively.

The HPLC–DAD–MS structure in Fig. 1a, designed by **D_{aug}**, contains all the chromatographic runs recorded during the process with the double DAD and MS detection in a single multiset structure [15,16]. **D_{aug}** obeys the following extended bilinear model:

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{\text{aug}}(\text{DAD/MS}) &= [\mathbf{D}_{1(\text{DAD/MS})}; \mathbf{D}_{2(\text{DAD/MS})}; \dots; \mathbf{D}_{N(\text{DAD/MS})}] \\ &= [\mathbf{C}_1; \mathbf{C}_2; \dots; \mathbf{C}_N] [\mathbf{S}_{\text{DAD}}^T; \mathbf{S}_{\text{MS}}^T] \\ &\quad + [\mathbf{E}_{1(\text{DAD/MS})}; \mathbf{E}_{2(\text{DAD/MS})}; \dots; \mathbf{E}_{N(\text{DAD/MS})}] \\ &= \mathbf{C}_{\text{aug}}(\text{DAD/MS}) \mathbf{S}_{\text{aug}}^T(\text{DAD/MS}) + \mathbf{E}_{\text{aug}}(\text{DAD/MS}) \end{aligned} \quad (2)$$

where **C_{aug}** is a column-wise augmented matrix formed by the **C_k** submatrices containing the pure elution profiles of the compounds in each chromatographic run and **S_{aug}^T** is a row-wise augmented matrix with their related UV and MS spectra, common to all chromatograms analyzed. Using the elution profiles obtained, kinetic profiles of the compounds can be derived from the evolution of their peak areas as a function of the process time.

The spectroscopic/chromatographic multiset structure in Fig. 1b holds also an extended bilinear model, analogous to that in Eq. (2). It is worth noting the different nature of the experiments in **D_{aug}**, formed by the spectroscopic experiment and the HPLC–DAD process runs, and in **C_{aug}**, which contains the kinetic profiles of

the spectroscopic experiment and the elution profiles from all the HPLC–DAD submatrices.

3.2. Data treatment

Multivariate curve resolution (MCR) designs a family of soft-modeling methods focused on decomposing a mixed raw data set (**D_k**) into the underlying bilinear model **C_kS_k^T**, formed by the pure spectra (**S_k^T**) and concentration profiles (**C_k**) of the individual components [14–16]. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) is an iterative resolution method that optimizes both **C** and **S^T** matrices using an alternating least-squares calculation procedure under constraints until the model **CS^T** minimizes as much as possible the error in the reproduction of the original data set, **D**. Such an operating procedure requires the previous determination of the number of contributions in the raw data set and the generation of **C** or **S^T** estimates to initialize the iterative optimization. Details about these steps can be found in previous literature [15,16].

The parameter used to indicate the fit quality of the MCR-ALS results is the percentage of lack of fit (% LOF), which are defined as follows:

$$\% \text{ LOF} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - \hat{d}_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (3)$$

where d_{ij} is an element of the raw data **D** and \hat{d}_{ij}^* is the same element obtained with the MCR-ALS model.

Constraints in MCR-ALS are used to provide meaningful shapes to the profiles in **C** and **S^T** and to suppress or minimize as much as possible the ambiguity in the final solutions [26–29]. Constraints are chemical or mathematical properties that the pure compound profiles should fulfill and they can be applied differently to the concentration and spectral direction, to the profiles of the different compounds and to the different submatrices in a multiset structure [14–16]. Typical constraints are: non-negativity, unimodality (the presence of a single maximum per profile), closure (mass balance in the concentration direction) and selectivity or local rank information (where some compounds are forced to be absent in some elution or spectral ranges). In multiset structures, the constraint of correspondence among species [14,15] acts as a selectivity/local rank constraint setting the absence of some compounds in full concentration submatrices of the augmented **C_{aug}** matrix.

When kinetic processes are analyzed, the hybrid variant of MCR-ALS using hard-modeling information (HS-MCR) becomes very useful [6,14]. HS-MCR works imposing a hard-modeling constraint, which works fitting a postulated kinetic model to the selected concentration profiles in the **C** matrix and replacing the initial concentration profiles by those generated from the fitted kinetic model. An adapted Newton–Gauss–Levenberg–Marquardt algorithm is used for the non-linear kinetic fitting step [4,30]. The hard-modeling constraint provides also the model rate constants and can be applied to all or to some of the concentration profiles, leaving external contributions to the process unconstrained [20–22]. In multiset structures, different kinetic models can be applied to different experiments [20,22] and data arrangements formed by model-based and model-free experiments can be handled [23,24]. The latter situation adapts to the multiset in this study formed by spectroscopic experiments (model-based) and chromatographic runs (model-free).

The MCR-ALS routine is in a MATLAB GUI that can be downloaded for free at: www.mcrals.info [31] and the HS-MCR routine is available on request.

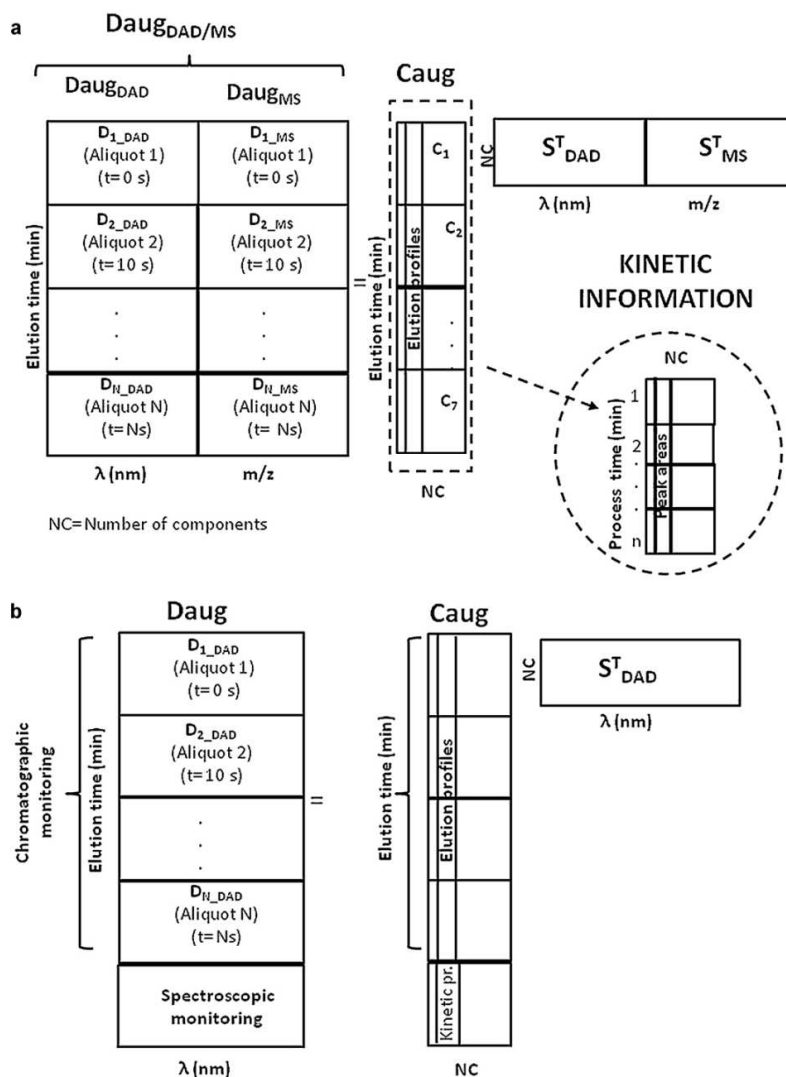


Fig. 1. (a) Bilinear model for fused HPLC-DAD-MS data. (b) Bilinear model for fused spectroscopic/chromatographic data.

4. Results and discussion

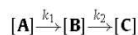
This section describes the knowledge that can be gathered about the mechanism of the photodegradation process and the identity of the products formed as a function of the data fusion and the modeling tool applied.

4.1. Analysis of a spectroscopic process monitoring experiment

The raw spectra obtained from the spectroscopic monitoring of the ketoprofen sample solution (**D**) confirmed the degradation of this compound under UV-light (see Fig. 2a). MCR-ALS was applied to these data using spectral initial estimates [32], non-negativity

(in **C** and **S^T**), and unimodality and closure constraints (in **C**). Three contributions were sufficient to model the data, with a lack of fit (% LOF) equal to 1.14% (see Fig. 2b).

The shape of the resolved concentration profiles suggested a kinetic model based on two consecutive first-order reactions.



where k_1 and k_2 are the rate constants. HS-MCR was applied and the kinetic model above was introduced as hard-modeling constraint. Fig. 2c shows the kinetic profiles (**C**) and pure spectra (**S^T**) obtained by HS-MCR, which keep the trends shown by the MCR-ALS analysis, and describe the data with a %LOF = 1.44. The consistent results

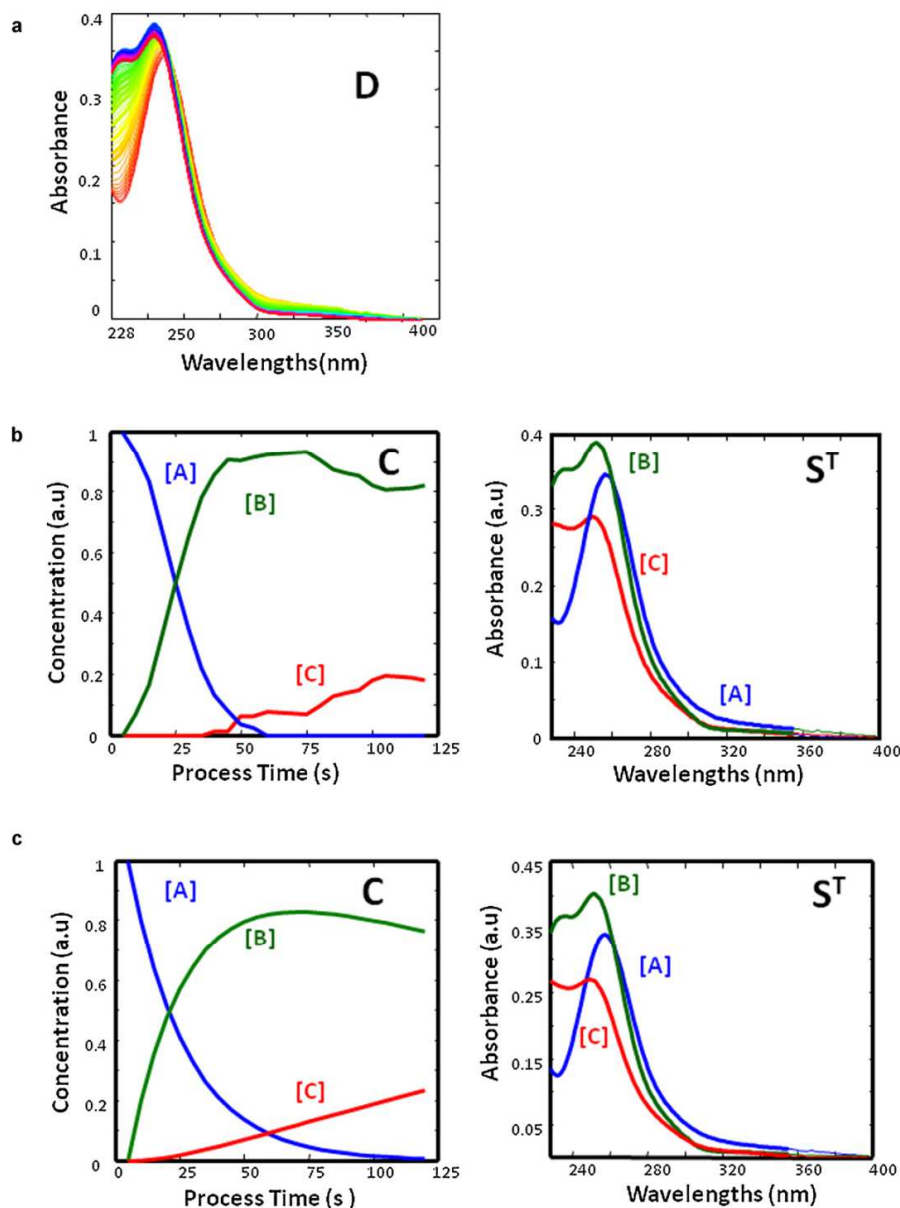


Fig. 2. (a) UV-vis raw spectra from spectroscopic monitoring of ketoprofen photodegradation. (b) MCR-ALS kinetic profiles and related pure spectra. (c) HS-MCR kinetic profiles and related pure spectra.

of HS-MCR and MCR-ALS support the correct choice of the kinetic model applied.

The photodegradation rate constants obtained were $k_1 = 0.0444 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 0.00286 \pm 0.00002 \text{ s}^{-1}$. The fast photodegradation of ketoprofen is in agreement with the results reported by other authors [33–35].

However, the sole information of this experiment does not allow knowing whether the contributions [B] and/or [C] correspond to a single chemical compound or to mixtures of compounds with very similar or identical kinetic profiles and/or spectra, which would induce the rank deficiency phenomenon. Previous studies reported that ketoprofen irradiated in aqueous buffer solution at pH 7.4

Table 1
Lack of fit (%) related to MCR-ALS analysis of LC-DAD data, LC-MS data and fused LC-DAD-MS data with different number of components.

Number of components	%Lack of fit		
	LC-DAD	LC-MS	LC-DAD-MS
4	11.75		
5	8.90	14.09	23.50
6	9.32	8.67	13.41
7		7.83	15.78

undergoes a complex decarboxylation process via intermediate radicals, which leads to the formation of more than two photoproducts [34,36]. In order to find out the real complexity of the photodegradation process, chromatographic monitoring was carried out on this system.

4.2. Analysis of fused HPLC-DAD-MS process runs

Chromatographic monitoring of ketoprofen photodegradation involved analyzing simultaneously the seven HPLC-DAD-MS runs collected during the ketoprofen photodegradation.

Before the fusion of the HPLC-DAD and HPLC-MS data matrices to form the row- and column-wise augmented HPLC-DAD-MS data set (see Fig. 1a) some data pretreatments were applied to synchronize the DAD and MS data. In the LC-DAD-MS analysis, the analytes go first through the DAD detector and afterwards through the MS detector. Due to this fact, a shift correction between the DAD and MS elution time scales within each run is required to compensate the constant time delay between the diode array detector and mass spectrometry detector responses. Afterwards, a linear interpolation (using interp1 MATLAB command) to compensate the different time interval among consecutive measurements in the DAD and the MS detector was also performed to work with the same elution time axis for both DAD and MS data. Finally, a constant scaling factor (i.e., DAD data multiplied by 45) was applied to balance the intensity differences among DAD and MS signals within each run was carried out to compensate the time delay between DAD and MS detection. Interpolation was also used to obtain the same elution time axis for both DAD and MS data. Finally, a scaling factor was applied to balance the intensity differences among DAD and MS signals.

MCR-ALS was applied using spectral initial estimates [32] and non-negativity (in **C** and **S^T**) and unimodality in the elution profiles. The constraint of correspondence of species allowed setting the presence of only the background contribution in the blank run and the parent compound and the background contribution in the chromatographic run from process time = 0. Fig. 3a–c shows the resolved UV–vis pure spectra and MS spectra from the matrix **S_{aug}^T** and the related elution profiles, **C_{aug}**, for the compounds involved in the ketoprofen photodegradation, respectively. Resolution of six species (five chemical compounds and a background contribution) was achieved with a satisfactory lack of fit and variance explained (%LOF = 13.41). As it can be seen in Table 1, for the analysis of fused LC-DAD-MS data, the best lack of fit was achieved with 6 components. The inclusion of a larger number of species resulted in worse data fit and meaningless mass spectra.

At this point, it is interesting to note the gain of using LC-DAD-MS fused data as compared with individual LC-DAD and LC-MS analysis. From the sole resolution of LC-DAD data, it was difficult to choose between 5 or 6 components due to the similar data fit (see Table 1) and the presence of similarly reliable spectra and elution profiles. However, the resolution of LC-MS data showed the clear need of six components to describe the system and, whereas the inclusion of an additional component resulted in a slightly better data fit, meaningless MS profiles were obtained (individual resolved profiles of LC-DAD and LC-MS data are not

shown for brevity, but are available on request). The analysis of fused LC-DAD-MS data clarified the right number of components through the evolution of the data fit and the interpretability of the final profiles obtained.

Going back to the final LC-DAD-MS results, the five process compounds modeled chromatographically confirm the incapability of obtaining a complete and reliable description of the ketoprofen photodegradation by the sole use of spectroscopic monitoring. The differences in the elution behavior helped to distinguish species involved in the photodegradation process, even though their kinetic profiles could be very similar.

It is interesting looking at the profiles in **C_{aug}** and at the UV and MS spectra in **S_{aug}^T** (Fig. 3c, a and b) to understand the power of this data fusion approach in modeling all compounds in the process. The elution direction in chromatography helps to make a clear difference between compounds with very similar spectra, e.g., UV spectra of **[A]**, **[B]** and **[E]**, and the spectral features from the double DAD-MS detection help to distinguish heavily coeluting compounds, such as **[B]**, **[C]** and **[D]**. The modeling and confirmation of the presence of all these compounds was much easier using the fused HPLC-DAD-MS data than using HPLC-DAD or HPLC-MS multiset structures separately.

The ketoprofen degradation photoproducts were identified from their MS resolved spectra (see Fig. 3b). Thus, the decarboxylation of ketoprofen (**[A]**) under light irradiation yielded to the formation of 3-(1-hydroperoxyethyl)benzophenone (**[M+H]⁺** = 243, **[B]**), 3-acetylbenzophenone (**[M+H]⁺** = 224, **[C]**), 3-(1-hydroxyethyl)benzophenone (**[M+H]⁺** = 227, **[D]**) and 3-ethylbenzophenone (**[M+H]⁺** = 211, **[E]**). Formation of these photoproducts has been reported on the basis of initial photodecarboxylation of the dissociated acid, which is the dominant species at pH 7.4 (ketoprofen pK is ca. 4.7), through the key intermediacy of a benzylic radical (not detectable within the time scale studied) [33–38]. Photoproducts **[B]** and **[D]** are thought to be responsible for the ketoprofen phototoxicity [34,36,39–41].

Using the elution profiles obtained in **C_{aug}**, kinetic profiles of the compounds can be derived from the evolution of their peak areas as a function of the process time (see Fig. 3d). The similar kinetic evolution among some of these photoproducts (**[C]**, **[D]** and **[E]**) makes understandable why they could not be modeled in the spectroscopic monitoring experiment, in which only kinetic evolution and UV spectral features come into play to distinguish among different species. Within the time scale studied, the complete decay of ketoprofen (**[A]**) is observed and the presence of one intermediate (**[B]**) and three end photoproducts (**[C]**, **[D]** and **[E]**).

Boscá et al. [34] suggested that the photodecarboxylation of ketoprofen proceeds via both benzylic radical and benzylic carbanion intermediates (not detectable in the working time scale). Benzylic carbanion intermediates are suggested to yield to the formation of the **[E]** photoproduct, whereas the formation of **[B]**, **[C]** and **[D]** photoproducts would be associated with the oxygenation of a benzylic radical. This fact and the kinetic evolution of the species in Fig. 3d suggested the proposal of a model where the formation of photoproduct **E** happens independently from the fate suffered by photoproducts **[B]**, **[C]** and **[D]**, which are more interconnected.

At this point, taking into consideration the shape of these kinetic profiles, the identity of the photoproducts formed and some complementary mechanistic references in the literature [34,37,38], the following kinetic mechanism could be plausible:



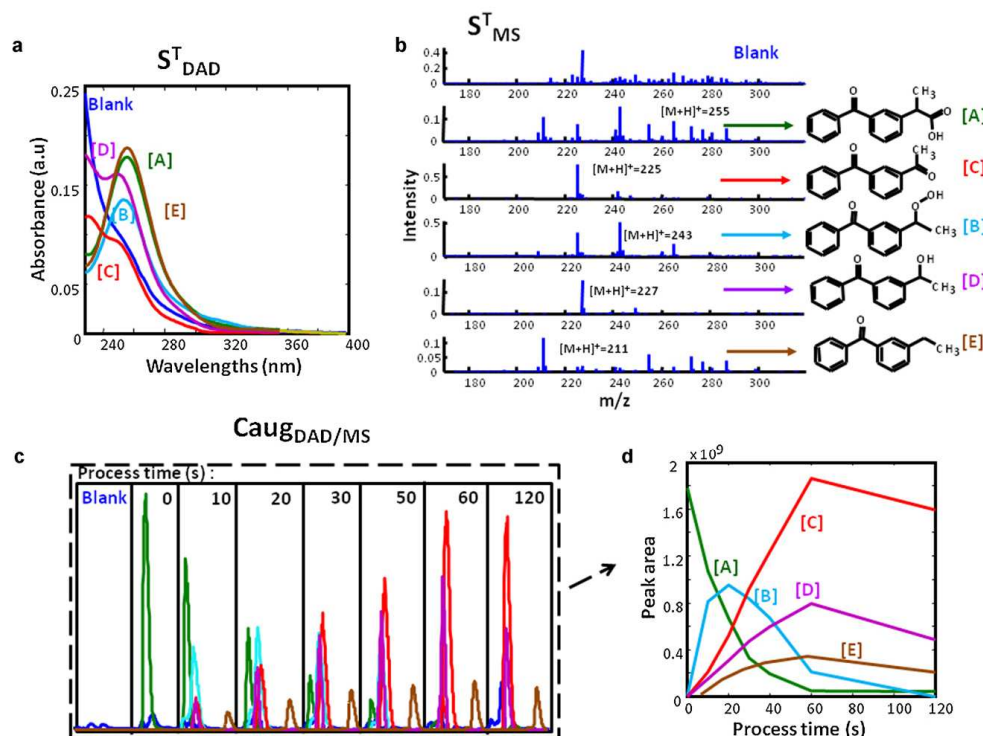


Fig. 3. MCR-ALS results of fused HPLC-DAD-MS analysis. (a) Resolved elution profiles of process chromatograms and blank run. (b) UV-vis resolved spectra (matrix S^T_{DAD}). (c) MS resolved spectra (matrix S^T_{DAD}) and related chemical structures. (d) Evolution of the area of peak areas as a function of process time.



where k_{1a} , k_{1b} , k_{2a} , k_{2b} and k_3 are the rate constants. However, this mechanism needs to be tested with an experiment where a more detailed time axis and, therefore, a more detailed kinetic evolution have been monitored.

4.3. Analysis of fused spectroscopic and chromatographic data (HPLC-DAD/DAD)

To provide a more comprehensive description of the kinetics linked to the photochemical degradation process of the ketoprofen, HS-MCR was applied to the fused spectroscopic/chromatographic (HPLC-DAD/DAD) data (see structure in Fig. 1b).

HS-MCR analysis of the fused HPLC-DAD/DAD data was performed using the resolved spectral profiles from the analysis of the fused HPLC-DAD-MS data as initial estimates. Non-negativity (in **C** and **S^T**) and correspondence of species (as applied in the HPLC-DAD-MS analysis) were the only soft-modeling constraints applied. Additionally, a hard-modeling constraint based on the kinetic

model proposed in the previous section was uniquely applied to the kinetic profiles in the spectroscopic monitoring experiment.

Only for the sake of fitting and due to the similarity between k_{1a} and k_{1b} and k_{2a} and k_{2b} , instead of taking the model proposed at the end of Section 4.2, the kinetic profiles were fitted according to the expressions: $[A] \xrightarrow{k_1} [B] + [C]$, where k_1 is an apparent constant representing parallel processes ruled by k_{1a} and k_{1b} , $[B] \xrightarrow{k_2} [C] + [D]$, where k_2 is an apparent constant representing the parallel processes ruled by k_{2a} and k_{2b} and $[A] \xrightarrow{k_3} [E]$ (it is important to note that the shape of the recovered profiles by the chemical model in Section 4.2 and the expressions used for the fitting task are identical when $k_{1a} = k_{1b}$ and $k_{2a} = k_{2b}$, but the fitting task is much more stable).

Fig. 4a and b shows the resolved augmented concentration matrix (**C_{aug}**) and the related UV-vis spectral profiles (**S^T**) for the fused HPLC-DAD/DAD data, respectively. The lack of fit and explained variance obtained are very satisfactory (%LOF=6.07) and very similar to the value obtained when these fused data were analyzed by soft-modeling MCR-ALS (%LOF=4.77) (results available on request). The small decrease in the lack of fit is a first indication of the good choice of the kinetic model, since no significant variation in the description of the experimental data is noticed with respect to the model-free analysis. **C_{aug}** (Fig. 4a) contains now the resolved elution profiles of the chromatographic runs related to the different process times and the kinetic profiles from the spectroscopic experiment (see zoomed Fig. 4a). The consistency between the resolved

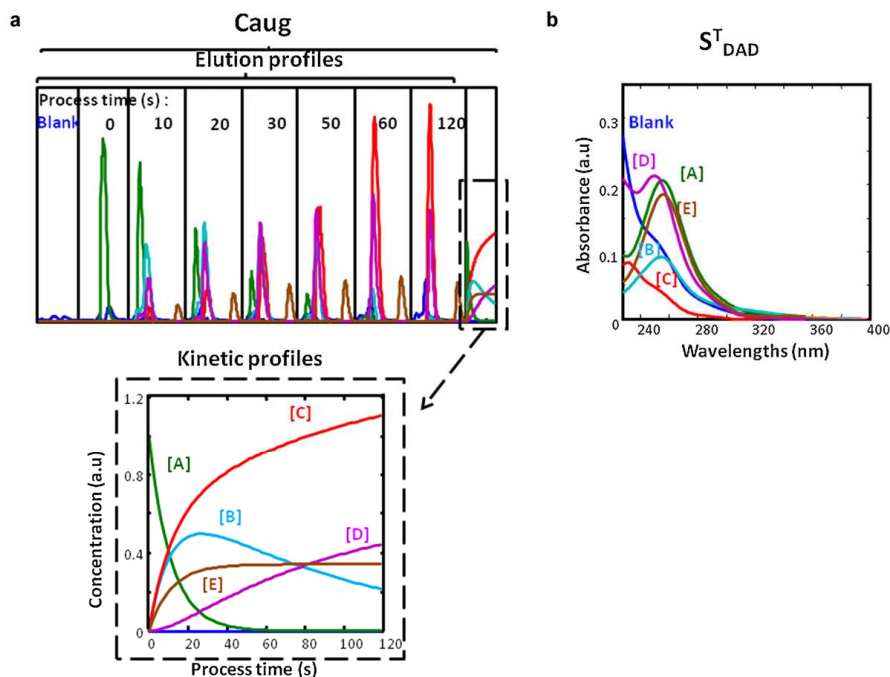


Fig. 4. HS-MCR of fused HPLC-DAD/DAD data. (a) Concentration profiles related to the submatrices of C_{aug} (zoomed kinetic profiles in bottom plot). (b) UV-vis pure resolved spectra.

elution profiles and pure spectra obtained in this analysis and in the previous HPLC-DAD-MS multiset indicates that the inclusion of the additional experiment (spectroscopic monitoring) and the related kinetic model are in agreement with the nature of the compounds previously modeled and identified.

As a result of the introduction of the hard-modeling constraint, final resolution results with less ambiguity were obtained and the photodegradation rate constants could be known ($k_1 = 0.058 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0.0104 \pm 0.0006 \text{ s}^{-1}$ and $k_3 = 0.030 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$). As before, the very fast decay of the parental compound (expressed by k_1), in agreement with the results found in the literature, is observed, but now a more complete description of the formation of the photoproducts, with the pathways governed by apparent rate constants k_1 and k_2 (representing parallel processes ruled by k_{1a} and k_{1b} and k_{2a} and k_{2b} , respectively) and by rate constant k_3 , could be also determined.

Both fused analysis of HPLC-DAD-MS and LC-DAD/DAD data seem to confirm that photolytic decarboxylation of ketoprofen, leading to the parallel formation of alcohols, peroxides and ketones, is a plausible description of the photodegradation process associated with this compound. These results are in agreement with complementary studies found in the literature and warn about the adverse effects of the photosensitivity of this product.

5. Conclusions

The synergy of the progress in analytical methodologies and data analysis tools results in the capacity of obtaining much better descriptions of the fate and identity of the products formed in a photodegradation processes.

Thus, HPLC-DAD-MS data treated with soft-modeling MCR-ALS provides a very powerful strategy for compound modeling and identification, which allows taking advantage of the complementary structural features of UV and MS spectra and of the differences in the elution pattern to distinguish among all the photoproducts in the process. The identification of the photoproducts and the evolution of the peak areas as a function of time enable the proposal of kinetic mechanisms linked to the process.

The combination of the spectroscopic/chromatographic multiset and the application of HS-MCR shows the synergic effects of analytical methodologies and data treatment at its best. The first synergy works at an analytical level, since the chromatographic information (good at differentiating among compounds) and the spectroscopic information (providing a good time-dependence description of the process) complement each other. And, finally, only a hybrid hard- and soft-modeling approach (HS-MCR) could allow dealing simultaneously with chromatographic experiments (which should be soft-modeled) with spectroscopic experiments (which allow the introduction of a kinetic fitting step).

The right combination of analytical measurements and data analysis tools proposed in this work is offered as a new general way to improve the knowledge linked to photodegradation (or in general) kinetic processes in many diverse chemical and scientific areas.

Acknowledgments

We acknowledge funding from the Spanish government (grant CTQ2009-11572 and CTM2008-03263/TECNO). The authors of this

work belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2009 SGR 45).

References

- [1] H.H. Tonnesen, *The Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor and Francis, London, 2003.
- [2] T.E. Doll, F.H. Frimmel, *Chemosphere* 52 (2003) 1757.
- [3] H. Mauser, G. Gauglitz, *Chemical Kinetics*, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [4] M. Maeder, Y.-M. Neuhold, *Practical Data Analysis in Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [5] A. de Juan, R. Tauler, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 207.
- [6] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 123.
- [7] E. Bezemer, S.C. Rutan, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 59 (2001) 19.
- [8] P. Gemperline, G. Puxty, M. Maeder, F.T. Dwight Walke, M. Bosserman, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2575.
- [9] A. de Juan, R. Tauler, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 184.
- [10] S. Mas, A. Carbó, S. Lacorte, A. de Juan, R. Tauler, *Talanta* 83 (2011) 1134.
- [11] K. Johnson, A. de Juan, S.C. Rutan, *J. Chemom.* 13 (1999) 331.
- [12] M. Amrhein, B. Srinivasan, D. Bonvin, M.M. Schumacher, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 33 (1996) 17.
- [13] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, *J. Chemom.* 12 (1998) 183.
- [14] A. de Juan, S.C. Rutan, M. Maeder, R. Tauler, in: D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 249.
- [15] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
- [16] A. de Juan, R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163.
- [17] E. Bezemer, S.C. Rutan, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 81 (2006) 82.
- [18] E. Peré-Trepat, R. Tauler, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 85.
- [19] E. Bezemer, S.C. Rutan, *Anal. Chim. Acta* 490 (2003) 17.
- [20] S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 18.
- [21] J. Diewok, A. de Juan, M. Maeder, R. Tauler, *Anal. Chem.* 75 (2003) 641.
- [22] L. Blanchet, C. Ruckebusch, A. Mezzett, J.P. Huvenne, A. de Juan, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6031.
- [23] G. Muñoz, A. de Juan, *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 198.
- [24] P. Cutler, P. Gemperline, A. de Juan, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 52.
- [25] M.E. Abdel-Hamid, L. Novotny, H. Hamza, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 587.
- [26] H. Abdollahi, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 108 (2011) 100.
- [27] R. Tauler, *J. Chemom.* 15 (2001) 627.
- [28] R. Tauler, M. Maeder, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 345.
- [29] R. Tauler, A.K. Smilde, B.K. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [30] M. Maeder, A. Zuberbuehler, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2220.
- [31] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101.
- [32] W. Windig, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 16 (1992) 1.
- [33] C.D. Borsarelli, S.E. Braslavsky, S. Sortino, G. Marconi, S. Monti, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 163.
- [34] F. Boscá, M.A. Miranda, G. Carganico, D. Mauleón, *Photochem. Photobiol.* 60 (1994) 96.
- [35] L.J. Martínez, J.C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11066.
- [36] L.L. Constanzo, G. de Guidi, G. Condorelli, A. Cambria, M. Fama, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 359.
- [37] A. Nakajima, M. Tahara, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 174 (2005) 89.
- [38] S. Monti, S. Sortino, G. de Guidi, G. Marconi, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 93 (1997) 2269.
- [39] C.F. Chignell, R.H. Sik, *Photochem. Photobiol.* 67 (1998) 591.
- [40] V. Lhiaubet, N. Paillous, N. Chouini-Lalanne, *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 670.
- [41] F. Boscá, M.A. Miranda, G. Carganico, D. Mauleón, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 3 (1995) 133.

5.1.1. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

En aquesta secció es presenta una discussió general dels dos treballs d'aquest capítol. L'objectiu general d'aquests treballs és:

- ✓ Revisar i proposar metodologia quimiomètrica per a l'anàlisi de dades ambientals relacionades amb la presència i el destí dels contaminants orgànics.

5.1.1.1. REVISIÓ DE LA METODOLOGIA QUIMIOMÈTRICA PER A L'ANÀLISI AMBIENTAL DE COMPOSTOS ORGÀNICS.

El nombre de publicacions sobre la utilització de mètodes quimiomètrics en la Química Ambiental creix de forma continuada i mostra la importància que té l'ús de la quimiometria en l'anàlisi de dades que provenen d'una campanya de seguiment o vigilància ambiental, d'una determinació analítica en mostres ambientals o d'un estudi de l'estimació de l'activitat toxicològica de contaminants ambientals. La informació recollida sobre l'aplicació dels mètodes quimiomètrics en aquests tipus de problemàtiques ambientals va ser publicada en forma d'article de revisió (vegeu Article 5.3-I). En aquesta revisió es van seleccionar treballs realitzats des de l'any 2000 i que estaven relacionats amb contaminants tals com pesticides, hidrocarburs aromàtics policíclics i altres contaminants orgànics, entre els quals es troben els retardants de flama estudiats en aquesta tesi.

Les dades obtingudes en campanyes de seguiment i vigilància ambiental mesuren la concentració de diversos contaminants en mostres recollides en diferents situacions geogràfiques o diferents períodes de temps. Aquestes

dades es poden estructurar en una taula o matriu de dades, o bé en forma d'estructures més complexes, com ara cubs o hipercubs de dades (*three* o *multi-way data*) o com a matrius de dades augmentades (*multiset data*). La Figura 5.1-1 mostra exemples de tipus de dades que es poden obtenir a partir d'aquestes campanyes de seguiment i vigilància ambiental.

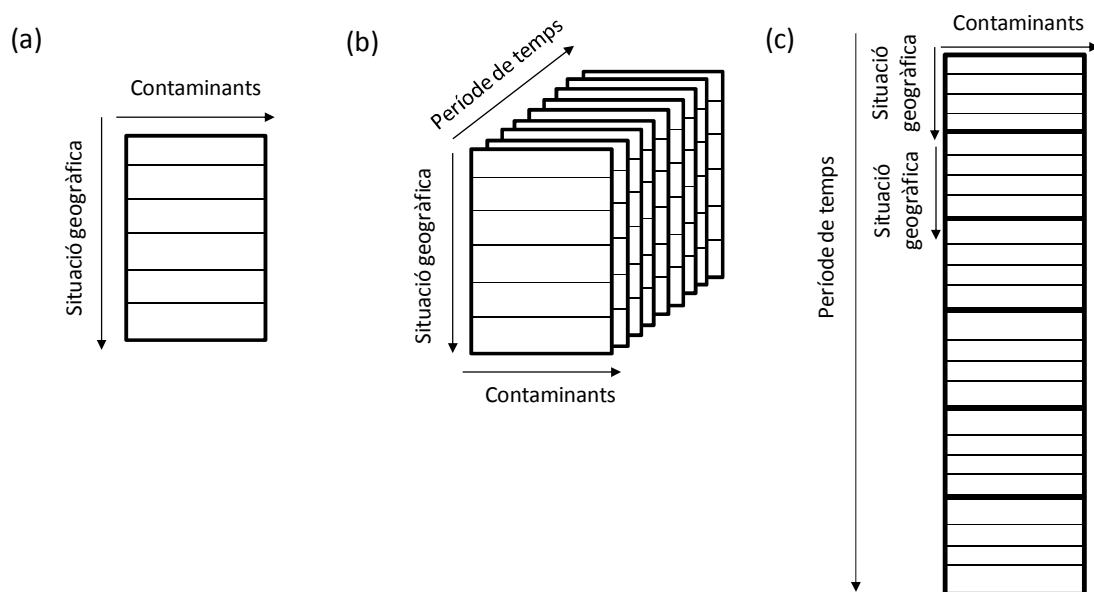


Figura 5.1-1. Tipus de dades procedents de campanyes de seguiment i vigilància ambiental. (a) Taula de dades (*two-way data*), (b) Cub de dades (*three-way data*) o (c) matrius augmentades (*multiset data*)

Les metodologies quimiomètriques ajuden a extreure el màxim d'informació d'aquests grans conjunts de dades, ja que els analitzen en la seva totalitat en lloc de fer-ho de manera parcial, variable a variable, tal com ocorre amb l'estadística clàssica.

Depenent de l'estructura que presentin les dades a analitzar, es podran aplicar diferents tipus de metodologies quimiomètriques, però generalment, totes

tenen com a objectiu comú caracteritzar el comportament de les fonts de contaminació. L'assumpció bàsica d'aquestes metodologies és que la variació total associada als canvis de concentració dels contaminants pot ser descrita amb un nombre reduït de fonts de contaminació d'origens diversos (industrial, agrícola...) definits per perfils que en descriuen la composició química i la distribució temporal o geogràfica.

En la taula 3 de l'article 5.1-I es mostra una selecció de treballs en què s'apliquen i es comparen diferents mètodes quimiomètrics en aquests estudis de seguiment i vigilància ambiental. Podem observar que una de les tècniques quimiomètriques més emprades en aquest tipus de dades ambientals és l'anàlisi per components principals (PCA). El mètode PCA permet visualitzar la informació de la taula de dades ambientals mitjançant una representació en un espai de dimensions més petites, els components principals, que mantenen tota la informació rellevant de les dades originals. El mapa de *scores* dóna idea de la similitud de les mostres analitzades i de com s'agrupen en funció del factor associat a les files de la taula original (localització geogràfica, període estacional,...) mentre que els *loadings* mostren la informació relativa a la composició de les fonts de la contaminació, tal i com es mostra en l'exemple de la Figura 5.1-2. A més, el nombre de components d'un model de PCA es pot assimilar al nombre de fonts de contaminació necessàries per a descriure la variació de la taula de dades original.

Matrix Factorization, PMF) [Paatero, 1994] i, més recentment, el MCR-ALS [de Juan, 2009; Tauler, 1995]. Quan les dades ambientals són més complexes, és a dir, es poden ordenar en cubs o hipercubs de dades, s'apliquen els mètodes d'anàlisi multidireccional (*multiway analysis*) com l'anàlisi de factors paral·lels (*Parallel Factor Analysis, PARAFAC*) [Bro, 1997], mètodes basats en models, el TUCKER [Tucker, 1972] o el mètode del motor multilineal (*Multilinear Engine, ME*) [Paatero, 1999]. També en aquest casos i, de forma especial, quan s'analitzen simultàniament taules de dades que no permeten la construcció d'estructures regulars cúbiques o hipercúbiques, però sí de matrius augmentades en la direcció de les files o les columnes, mètodes basats en l'ús de models bilineals, com el mètode PCA o MCR-ALS [Tauler, 2000], són les opcions més adequades. En el cas de MCR-ALS es té l'avantatge de la interpretabilitat dels perfils associats a les fonts de contaminació gràcies a l'ús de restriccions, com la no-negativitat. La Figura 5.1-3 mostra un exemple de l'aplicació de MCR-ALS a dades multiconjunt en què es caracteritza la composició de cinc fonts de contaminació i la seva distribució temporal i geogràfica.

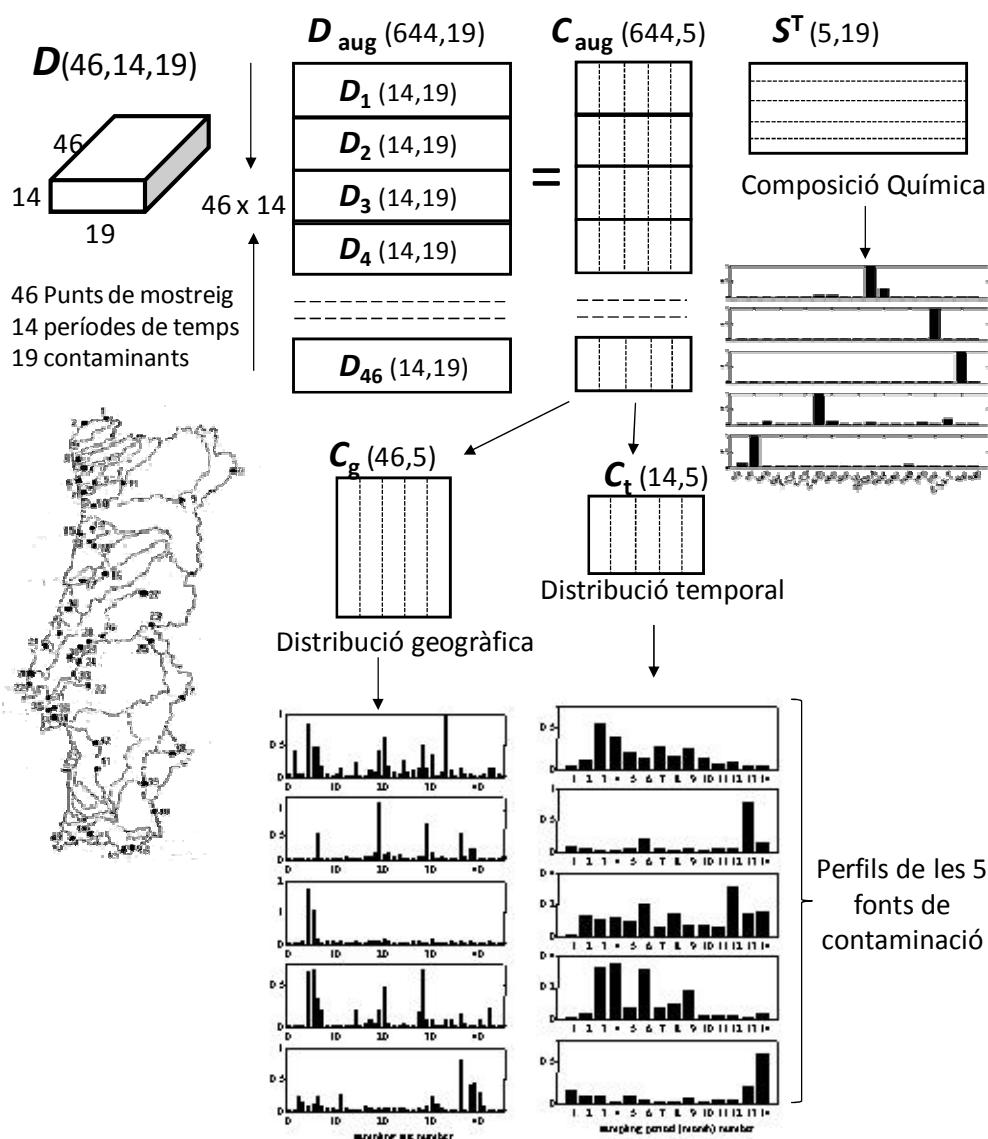


Figura 5.1-3. Resultats de l'anàlisi mitjançant MCR-ALS d'un estudi de seguiment ambiental en el qual s'han determinat 19 contaminants orgànics en 46 punts de mostreig de les aigües superficials de Portugal i en 14 períodes de temps diferents. C_g i C_t es calculen a partir de les mitjanes apropiades dels perfils C_{aug} . Font Salau i col·laboradors [Tauler, 2001].

Les dificultats en la determinació quantitativa dels contaminants en mostres ambientals es deuen a la complexitat inherent de les mostres naturals i als baixos nivells en què es troben aquests compostos. Aquesta determinació

analítica es duu a terme fonamentalment amb mètodes cromatogràfics acoblats a diferents sistemes de detecció. No obstant això, aquestes metodologies són relativament cares, suposen temps d'anàlisi llargs i sovint requereixen pretractament de la mostra abans de la seva injecció. Altres autors han proposat estratègies alternatives basades en deteccions fluorimètriques i fosforimètriques que permeten l'anàlisi de compostos a nivells de concentració molt baixos. Aquestes metodologies espectroscòpiques, però, presenten una selectivitat limitada sobretot quan s'han d'analitzar compostos similars en mostres complexes. La manca de selectivitat, la presència d'interferències i altres problemes que presenten aquestes estratègies tradicionals experimentals poden ser resoltes mitjançant l'aplicació de mètodes quimiomètrics adequats.

La utilització dels mètodes quimiomètrics permet l'anàlisi qualitativa i quantitativa de mostres complexes multicomponent sense la necessitat d'etapes químiques de separació d'interferències. Els principals avantatges que deriven de tot això són un coneixement més ampli del problema i una reducció important de costos i temps d'anàlisi. Tot això ha produït un gran augment dels articles relacionats amb l'ús dels mètodes quimiomètrics per a la determinació analítica dels contaminants.

Entre la gran varietat de tècniques quimiomètriques existents, les aplicades per a la determinació quantitativa de contaminants són les tècniques de calibratge multivariant. Aquestes metodologies permeten establir la relació entre la resposta instrumental mesurada i la quantitat d'espècie química que es vol quantificar. El calibratge clàssic univariant relaciona una variable instrumental i una propietat a predir (per exemple, absorbància a una longitud d'ona amb la concentració d'anàlit). En el calibratge multivariant, s'utilitza

una reposta multivariant (per exemple, un espectre complet o un cromatograma de HPLC-DAD) i es pot predir la concentració d'un o més anàlits simultàniament.

Les tècniques instrumentals ens proporcionen diferents tipus de dades. Depenent de l'estructura que tinguin aquestes dades i les necessitats de cada cas, s'escull un o un altre mètode de calibratge. Quan la mesura proporciona un vector de dades (per exemple, espectres o cromatogrames TIC), el conjunt de calibratge que es construeix és una matriu i s'utilitzen els mètodes de calibratge multivariant de primer ordre que permeten determinar un anàlit en presència d'interferències, sempre que es disposi de patrons o mostres de calibratge que continguin les possibles espècies interferents (vegeu exemple en Figura 5.1-4). Si la resposta instrumental és una matriu de dades (per exemple, un cromatograma adquirit a diferents longitud d'ona, HPLC-DAD, o un espectre de fluorescència bidimensional) el conjunt de calibratge que es construeix pot ser una matriu augmentada (vegeu exemple Figura 5.1-5) o un cub (vegeu exemple Figura 5.1-6) i s'utilitzen els mètodes de calibratge multivariant de segon ordre. En aquest cas es poden determinar les concentracions dels anàlits d'interès utilitzant patrons que no continguin interferències (avantatge de segon ordre [Booksh, 1994]). Per dades més complexes, de tres o més direccions, existeixen mètodes de calibratge multivariant d'ordre superior.

Resposta multivariant = Vector \longrightarrow Conjunt de calibratge = matriu

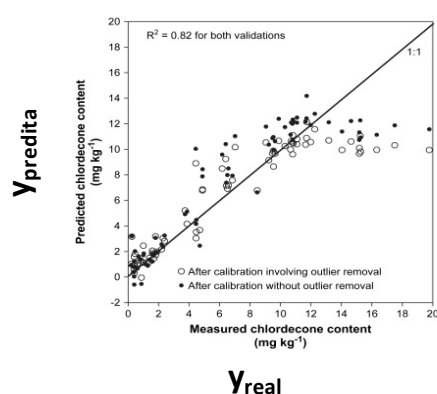
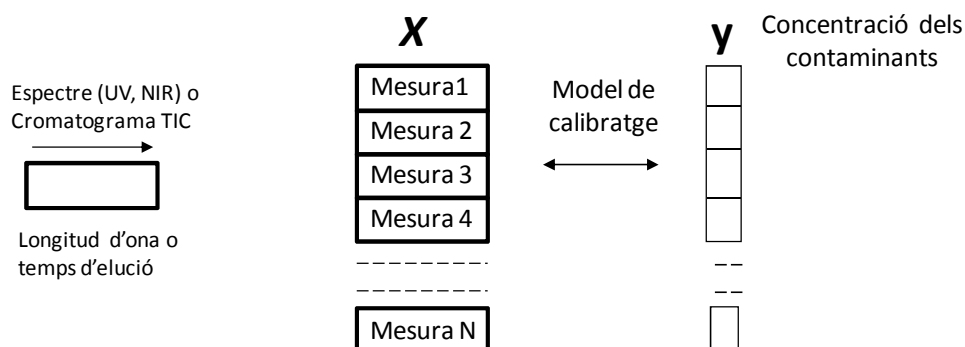


Figura 5.1-4. Representació gràfica del calibratge multivariant de primer ordre. Resultat del calibratge mitjançant PLS d'un estudi de determinació analítica del pesticida clordecona mitjançant espectroscòpia NIR. Font Brunet i col·laboradors [Brunet, 2009].

Resposta multivariant = matriu \longrightarrow Conjunt de calibratge = matriu augmentada
Ex: HPLC-DAD

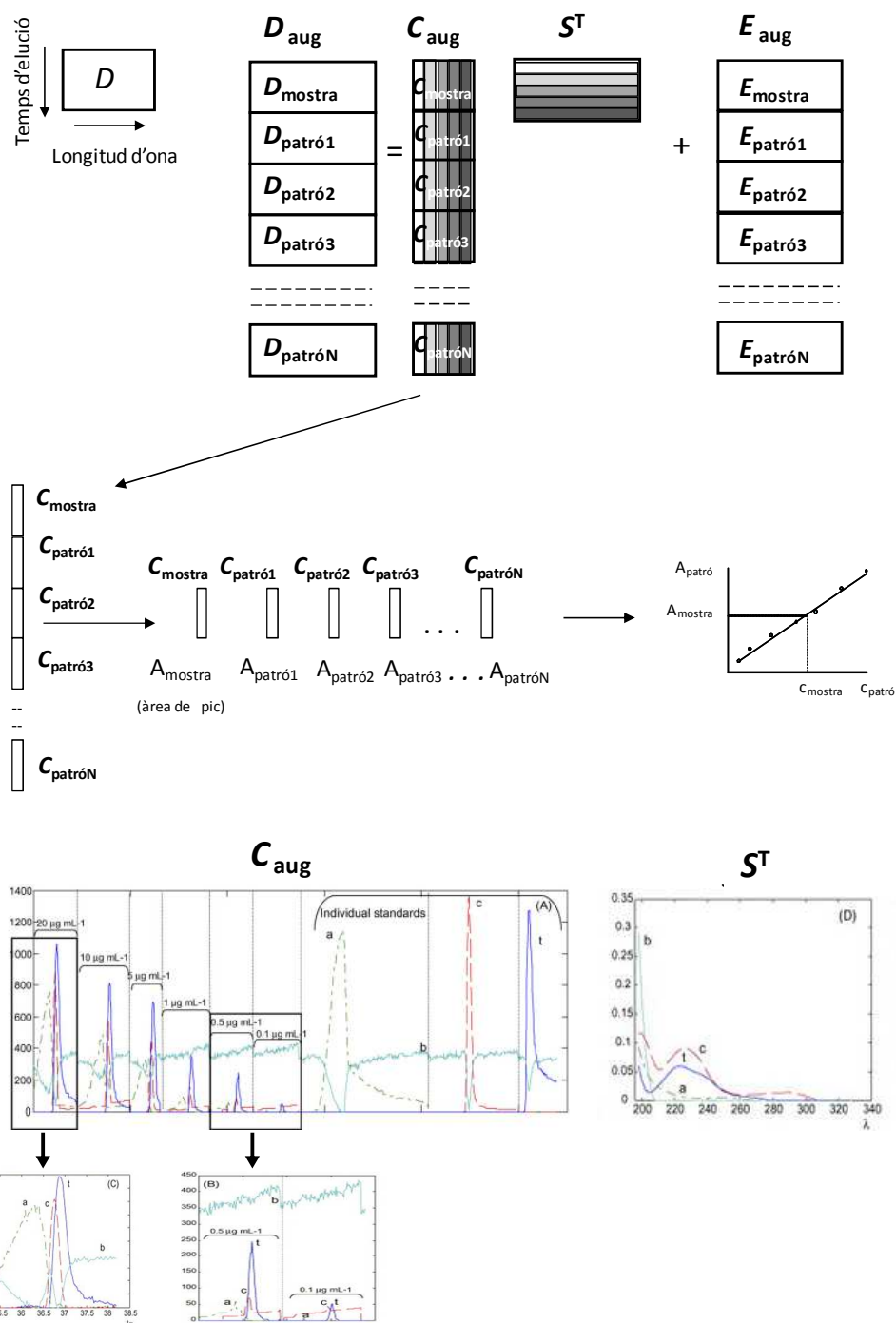


Figura 5.1-5. Representació gràfica del calibratge multivariant de segon ordre. Exemple de matriu augmentada com a conjunt de calibratge. Resultat de la resolució mitjançant MCR-ALS de la determinació analítica amb HPLC-DAD de patrons de pesticides a diferents concentracions. Font Peré-Trepà i col·laboradors [Peré-Trepà, 2006b].

Resposta multivariant = matriu \longrightarrow Conjunt de calibratge = cub de dades

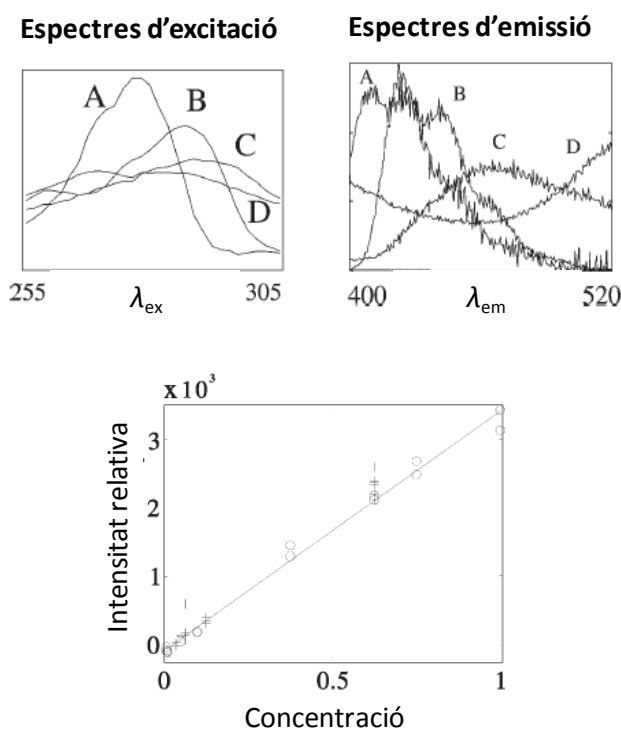
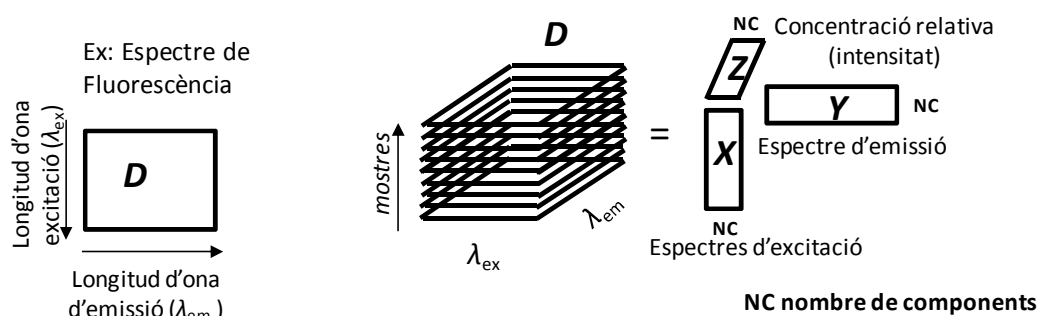


Figura 5.1-6. Representació gràfica del calibratge multivariant de segon ordre. Exemple de cub de dades com a conjunt de calibratge. Resolució i determinació analítica de 4 PAHs mitjançant espectres de fluorescència bidireccionals i PARAFAC. Font Nahorniak i col·laboradors [Nahorniak, 2003].

En el recull de treballs relacionats amb els plaguicides (vegeu Taula 2 en l'article 5.1-I) es mostra que malgrat els avantatges dels mètodes de calibratge d'ordre superior, moltes de les determinacions d'aquests compostos són prou bones si s'utilitzen mètodes de calibratge de primer ordre. No obstant això, hi ha alguns exemples en els quals s'utilitzen mètodes de calibratge de segon ordre, com MCR-ALS o PARAFAC. Les propietats fluorescents dels hidrocarburs aromàtics policíclics fan que els mètodes de calibratge de segon ordre i d'ordre superior siguin els més utilitzats per a la determinació d'aquests compostos, particularment el mètode PARAFAC, ja que els espectres de fluorescència bidireccional compleixen de manera natural el model trilineal d'aquest mètode.

Els mètodes de segon ordre se solen aplicar més freqüentment en determinacions analítiques mitjançant tècniques de separació acoblades, que s'han dut a terme en mostres naturals d'alta complexitat, en què els nivells de concentració dels anàlits són baixos i en què aconseguir un conjunt de calibratge representatiu que inclogués els interferents (com cal en mètodes de primer ordre) seria una tasca molt complicada.

Els contaminants orgànics sovint produeixen efectes tòxics. Existeixen diversos mètodes *in vivo* i *in vitro* per tal de determinar la resposta toxicològica o biològica a l'exposició a aquests contaminants. No obstant això, aquests mètodes són costosos, sacrifiquen animals i consumeixen molt de temps. Això explica la manca de disponibilitat de paràmetres toxicològics experimentals per a molts contaminants. Els models de relacions quantitatives estructural-activitat (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) són una eina molt bona per tal d'avaluar els efectes toxicològics d'un contaminant. Els models QSAR descriuen relacions matemàtiques senzilles entre unes propietats

experimentals mesurades en un conjunt de compostos químics (sovint activitat toxicològica o biològica) amb paràmetres teòrics o experimentals relacionats amb l'estructura química d'aquests compostos. D'aquesta manera, els models QSAR permeten predir propietats de difícil mesura a partir del coneixement d'uns paràmetres estructurals fàcils d'obtenir. Això és particularment útil per a nous contaminants, en què la propietat toxicològica o biològica d'interès no és coneguda.

Els models QSAR s'expressen mitjançant aquesta equació:

$$Y = \sum_i c_i X_i \quad \text{Equació 5.1-1}$$

on Y representa l'activitat toxicològica o biològica (o, en general, la propietat que es vol predir) i X_i , cada paràmetre (descriptor) que es deriva de les estructures químiques dels compostos i c_i , la importància d'aquell paràmetre en la descripció de la propietat Y .

Per a desenvolupar i validar aquests tipus de models s'han utilitzat diversos mètodes quimiomètrics. En una primera fase, els mètodes quimiomètrics s'empren per a seleccionar els descriptors químics (X_i) més rellevants associats a la propietat (toxicològica o biològica) a predir. Els mètodes més utilitzats amb aquesta finalitat són la regressió per etapes (*stepwise regression*) [Weisberg, 1985], el PCA i els algoritmes genètics (GA) [Goldberg, 1989]. El següent pas consisteix en utilitzar un mètode quimiomètric per a desenvolupar pròpiament el model QSAR (Equació 5.1-1), que sigui el més robust possible i tingui una bona capacitat predictiva. Diferents mètodes quimiomètrics s'han emprat amb aquest objectiu: (a) mètodes de regressió lineal; entre ells, el més

utilitzat és el mètode de regressió de mínims quadrats parcials (*partial least squares*, PLS) [Geladi, 1986], (b) tècniques no lineals, de les quals les més utilitzades són les xarxes neuronals artificials (*artificial neural networks*, ANN) [Haykin, 1999] i màquines de suport vectorial (*support vector machines*, SVM) [Haykin, 1999] i (c) mètodes de classificació, entre els quals el mètode de K veïns més propers (*K-nearest neighbours*, KNN) [Schalkoff, 1992] i el mètode de classificació i arbre de regressió (*Classification and regression tree*, CART) [Schalkoff, 1992] van ser els més emprats.

Aquesta revisió bibliogràfica sistematitza l'ús d'un mètode quimiomètric o d'un altre en funció de la naturalesa i de l'estructura de les dades i de l'objectiu de l'estudi.

5.1.1.2. PROPOSTA DE METODOLOGIA QUIMIOMÈTRICA PER A LA INTERPRETACIÓ I SEGUIMENT DE PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ.

Els processos de fotodegradació són de gran importància en el context del medi ambient i en l'àmbit farmacèutic, ja que el destí i la identitat dels fotoproductes sovint estan vinculats a la contaminació o a problemes de toxicologia. Una descripció completa d'un procés de fotodegradació implica la identificació dels fotoproductes formats i l'elucidació del mecanisme que regeix el procés.

En aquest sentit, els objectius específics d'aquesta secció són:

- ✓ La proposta d'una metodologia de seguiment experimental, tractament quimiomètric i interpretació de resultats que sigui vàlida per a l'estudi

de qualsevol procés de fotodegradació.

- ✓ L'ús de diferents tècniques instrumentals (espectroscòpiques i cromatogràfiques) per al seguiment de processos de fotodegradació i l'exploració dels acoblaments d'aquestes mesures per tal d'aconseguir extraure la màxima informació del procés en estudi.
- ✓ La discussió des les limitacions i els avantatges associats a les diferents tècniques instrumentals per al seguiment de processos i a l'anàlisi de dades utilitzat en la seva interpretació.
- ✓ L'estudi de nous acoblaments multiexperiment o multitècnica i de la seva anàlisi simultània mitjançant MCR-ALS i HS-MCR per a obtenir una descripció més completa i fiable sobre el procés estudiat.

A partir dels estudis de fotodegradació realitzats en aquesta tesi, s'ha dissenyat un esquema metodològic per al seguiment i interpretació d'aquest tipus de processos, en el qual se segueixen els següents passos:

1. Aplicació de MCR-ALS i HS-MCR a les dades del seguiment espectroscòpic d'absorció molecular.
2. Aplicació de MCR-ALS a les dades del seguiment cromatogràfic amb detecció DAD i detecció MS separatament.
3. Aplicació de MCR-ALS a la fusió de senyals cromatogràfiques DAD-MS utilitzant l'estratègia d'augmentació de matrius per files i per columnes.
3. Aplicació de HS-MCR a la fusió de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques utilitzant estratègia d'augmentació de matrius per columnes.

A continuació, es farà una breu descripció de cadascuna d'aquestes etapes

5.1.1.2 1. SEGUIMENT CINÈTIC PER ABSORCIÓ MOLECULAR

El seguiment d'un procés a partir de l'enregistrament d'espectres UV recollits durant la seva realització proporciona una única matriu de dades que conté tota la informació del procés (vegeu Figura 4.3 del capítol de tractament de dades). Per tal d'extreure informació sobre el procés, primerament es duu a terme una anàlisi exploratòria de les dades mitjançant MCR-ALS. Aquest mètode de modelització flexible s'aplica per a la resolució dels perfils de concentració i dels espectres purs de les espècies que participen en el procés. La resolució es duu a terme seguint el procediment descrit en la secció 4.4.2. A partir de la forma dels perfils de concentració resolts es pot conèixer qualitativament l'evolució o contribució de cadascuna de les espècies modelades i es pot postular un possible mecanisme del procés de fotodegradació.

A continuació s'analitzen les dades individualment mitjançant el mètode HS-MCR. Com s'ha comentat en la secció 4.4.3, aquest mètode és una variant del mètode clàssic MCR-ALS que incorpora una nova restricció de model rígid que força alguns o tots els perfils de concentració de les espècies formades a seguir un model cinètic. La inclusió del model cinètic no pot variar significativament el valor del % de variància o de la manca d'ajust respecte l'anàlisi amb MCR-ALS i ha de mantenir el significat químic dels perfils de concentració i dels perfils espectrals perquè sigui vàlid. Aquesta nova restricció permet calcular el valor de les constants de velocitat del procés per al model cinètic suggerit per l'anàlisi amb modelització flexible, disminuir

l'ambigüitat rotacional associada als perfils de concentració resolts i confirmar el model proposat.

Un cop s'ha descrit l'evolució de les dades individualment, es pot procedir a l'anàlisi simultània de diferents experiments, que dona perfils espectrals més robustos i fiables, una major definició dels perfils cinètics del procés, així com una determinació més acurada de les constants cinètiques. En aquest cas s'utilitza l'estratègia de matriu augmentada per columnes que analitza simultàniament experiments realitzats en diferents condicions (per exemple composicions de solvent (vegeu Figura 5-1-7-a) o rèpliques d'experiments (vegeu Figura 5-1-7-b). Quan alguns dels experiments de la matriu augmentada estan fets en les mateixes condicions, se'ls pot fer obeir un model cinètic global comú.

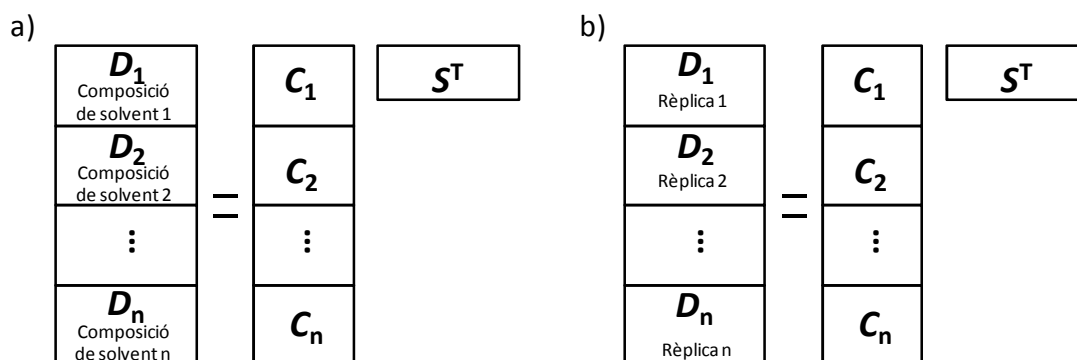


Figura 5.1-7. Anàlisi simultània (a) d'experiments que s'han realitzat en diferents composicions de solvent i (b) rèpliques d'experiments.

Cal remarcar que sovint amb poques contribucions es pot modelar l'evolució de tot el procés, tot i que el sistema sigui més complex (el nombre d'espècies químiques involucrades en el procés sigui superior). Això pot succeir si es tenen espècies amb una evolució cinètica idèntica, amb espectres purs molt

semblants o si són molt minoritàries. En termes quimiomètrics, això és causa del fenomen de deficiència de rang (vegeu secció 4.4.2.4.2 [Amrhein, 1996; Izquierdo-Ridorsa, 1997]) Per a veure si existeix aquest fenomen és necessari realitzar els experiments de seguiment cromatogràfic del procés, que permetran detectar tots els productes de degradació, ja que els correspondran perfils d'elució diferents gràcies a la separació cromatogràfica.

5.1.1.2.2. SEGUIMENT CINÈTIC PER CROMATOGRAFIA AMB DETECCIÓ DAD-MS

El seguiment cromatogràfic d'un procés per HPLC-DAD o HPLC-MS proporciona diverses matrius de dades (una per cada cromatograma associat a un temps de procés). Per tant, en aquest cas és interessant l'anàlisi simultània de totes aquestes matrius (matriu augmentada per columnes) per a obtenir la informació global del procés de fotodegradació.

Per a extreure la informació d'aquestes dades s'utilitza el mètode MCR-ALS que permet la resolució dels perfils d'elució i dels espectres purs de les espècies formades. L'evolució cinètica del procés es coneix a partir de la representació de les àrees dels pics cromatogràfics resolts en funció del temps de procés (vegeu Figura 5.1-8).

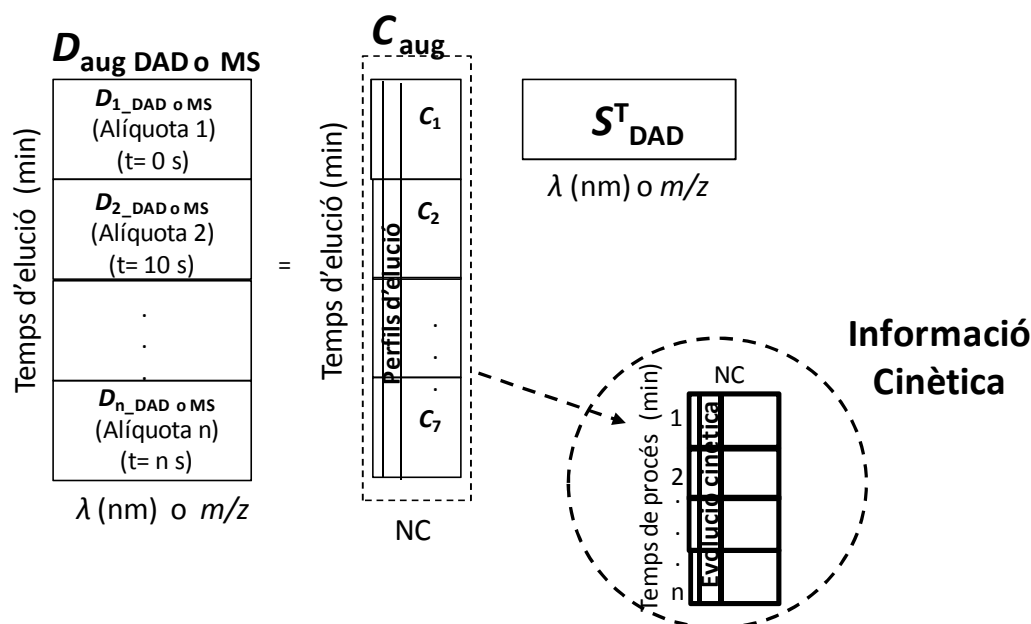


Figura 5.1-8. Anàlisi simultània de les matrius que ens dona el seguiment cromatogràfic d'un procés. NC significa nombre de components

Primerament s'analitzen les dades generades per tots dos detectors (DAD i MS) per separat. De vegades, a partir de l'anàlisi de les dades de HPLC-MS es modelen menys compostos o contribucions que amb l'anàlisi de les dades de HPLC-DAD. Aquest fet té diferents causes possibles. En primer lloc, les dades de HPLC-MS poden presentar més soroll de fons, la qual cosa dificulta la detecció d'espècies minoritàries. A més, és possible que els productes de fotodegradació puguin tenir espectres de masses similars si són isòmers o tenen el mateix pic molecular. Finalment, també es pot donar el cas que hi hagi compostos que només es troben mitjançant un dels sistemes de detecció.

Aquests fets fan que no sempre l'acoblament entre les dades cromatogràfiques obtingudes amb els dos sistemes de detecció sigui fàcil. En cas que l'acoblament no sigui possible, la resolució de les dades HPLC-DAD permetrà modelar totes les espècies involucrades en el sistema i donarà una idea sobre

l'evolució cinètica dels productes de degradació a partir de la representació de les àrees dels pics resolts en funció del temps de procés. D'altra banda, la resolució de les dades HPLC-MS permetrà la caracterització i la possible identificació dels productes de fotodegradació.

En el cas que els resultats obtinguts amb les dues anàlisis permetin fer una bona correspondència d'espècies, es procedeix a l'acoblament entre les dades obtingudes amb els dos sistemes de detecció formant una matriu augmentada en la direcció de les files i les columnes.

5.1.1.2.3 ANÀLISI DE LES DADES ACOBLADES DELS CROMATOGRAMES HPLC-DAD-MS

En tractar els cromatogrames de l'experiment cromatogràfic amb els 2 sistemes de detecció (DAD-MS) de manera simultània mitjançant MCR-ALS (vegeu estratègia en Figura 5.1-9) el resultat obtingut és de major qualitat, ja que inclou molta més informació en l'anàlisi, disminueix l'ambigüitat i, com a conseqüència, els perfils obtinguts són molt més robustos i estan menys afectats pel soroll experimental. A més, permet obtenir una millor caracterització dels productes de degradació (espectres MS) i continua aportant informació sobre la seva evolució cinètica a partir de la gràfica de les àrees dels pics resolts en funció dels diferents temps de procés.

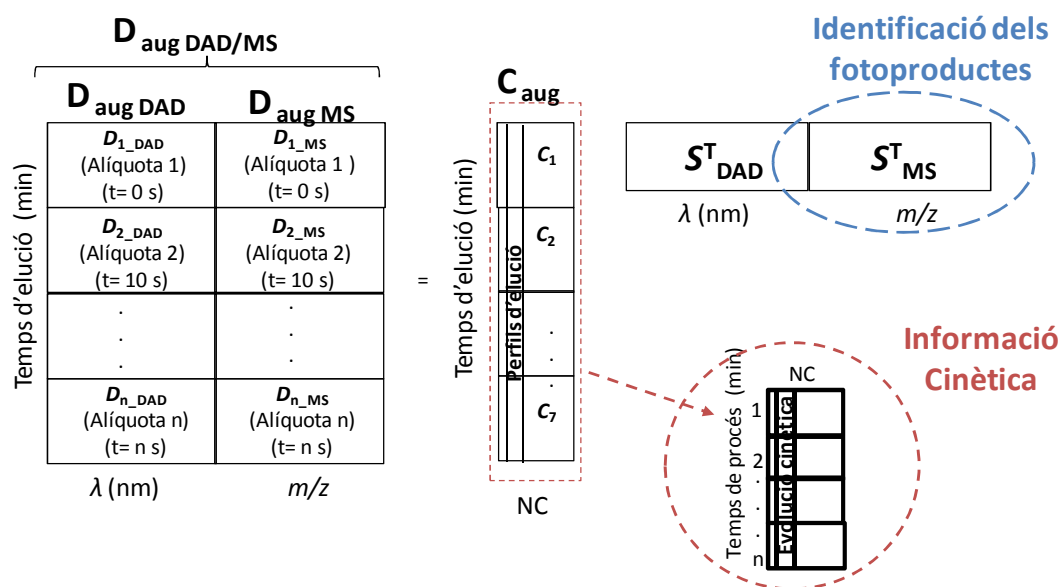


Figura 5.1-9. Estratègia de l'acoblament de les dades HPLC-DAD-MS.

Tots dos tipus de dades s'han adaptat abans de ser fusionats. Els anàlits passen primer a través del detector DAD i després a través del de MS, degut a que aquest últim sistema de detecció destrueix la mostra mentre que el DAD no ho fa. Per tant, primer de tot s'ha de corregir el decalatge que es produeix entre els diferents temps d'adquisició dels cromatogrames de tots dos tipus de detectors. En segon lloc, s'han d'interpol·lar les dades de manera que coincideixin els eixos de temps d'elució del detector DAD i del detector MS. Per últim, les dades s'han d'escalar de manera adequada per tal que els valors de totes dues respostes instrumentals (DAD i MS) tinguin magnituds similars i, en conseqüència, una importància comparable en l'anàlisi global.

A continuació, la Figura 5.1-10 mostra un esquema resum de la metodologia a seguir per a analitzar les dades d'un seguiment cromatogràfic, així com la informació que s'obté en cada cas.

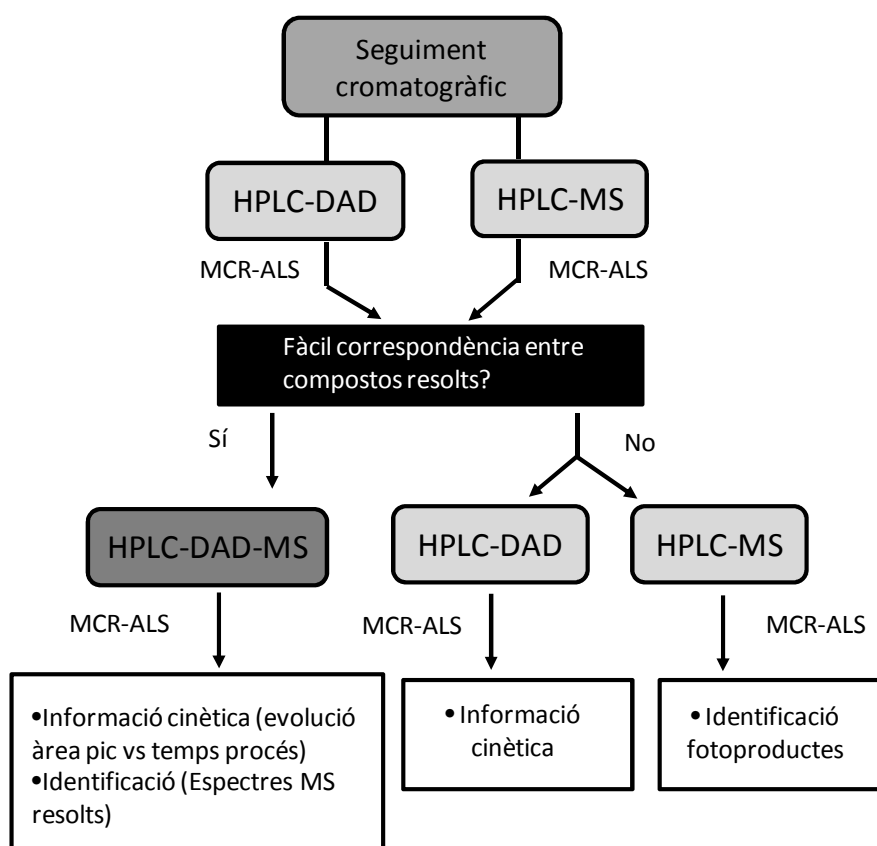


Figura 5.1-10. Esquema resum de la metodologia a seguir per analitzar les dades del seguiment cromatogràfic d'un procés de fotodegradació.

L'experiment cromatogràfic fa un seguiment cinètic menys exhaustiu que l'experiment de seguiment espectroscòpic. Si en l'experiment espectroscòpic, s'adquiria un espectre de la solució de mostra cada pocs segons, el que equival a uns centenars de temps de procés, en l'experiment cromatogràfic només es tenen unes quantes alíquotes corresponents a diferents temps de procés, que han estat elegides de manera que siguin el més representatives possibles. No obstant això, aquest tipus d'experiment dóna una major informació per a la diferenciació i la caracterització dels compostos.

En el cas que el nombre de components modelats en el seguiment cinètic per absorció molecular fos igual al nombre de components modelats en el

seguiment cinètic per cromatografia, l'anàlisi de cadascun d'aquests experiments per separat proporcionaria tota la informació necessària per a descriure el sistema: l'evolució, la contribució i la identificació (espectres de MS) de totes de les espècies presents en el sistema.

És freqüent, però, que el nombre de components resolts en les dades de l'experiment cromatogràfic sigui superior a l'obtingut a partir de l'experiment espectroscòpic. Si el nombre de components detectats cromatogràficament és molt superior, les informacions extretes de cada experiment seran complementàries. Per una banda, l'experiment cromatogràfic ens proporcionarà una idea sobre l'evolució cinètica de tots els productes de degradació (a partir de la representació de les àrees de pic en funció del temps de procés analitzats) i una possible identificació dels productes de fotodegradació (a partir dels espectres de MS). Per altra banda, l'experiment espectroscòpic ens proporcionarà les constants cinètiques aparents del mecanisme cinètic; és a dir, les constants associades a les contribucions modelades. En aquest context, cal aclarir que cada contribució s'associa a una mescla de components de comportament cinètic idèntic o molt semblant. Per això es parla de constants aparents.

Idealment, ens podem trobar en el cas que la diferència de nombre de components resolts en ambdós experiments no sigui molt gran. En aquestes circumstàncies, és una bona opció analitzar les dades de l'experiment cromatogràfic amb detecció DAD acoblades amb les dels experiments per seguiment espectroscòpic formant una matriu augmentada en la direcció de les columnes. Aquesta matriu augmentada tindria la mateixa informació de temps de procés que l'experiment espectroscòpic i la capacitat de diferenciar entre components de l'experiment cromatogràfic.

5.1.1.2.4. ANÀLISI DE L'ACOBLAMENT DE LES DADES ESPECTROSCÒPIQUES I CROMATOGRÀFIQUES

Amb l'anàlisi simultània de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques formant una matriu augmentada en la direcció de les columnes (vegeu estratègia en la Figura 5.1-11) s'obté una millor descripció de la cinètica del procés a causa de que tenim una bona definició del temps de procés donada per l'experiment espectroscòpic. A més, gràcies a la informació cromatogràfica es pot modelar totes les espècies presents en el procés i s'elimina la deficiència de rang que puguin presentar les dades espectroscòpiques pel fet que els compostos presentin perfils cinètics idèntics o molt similars.

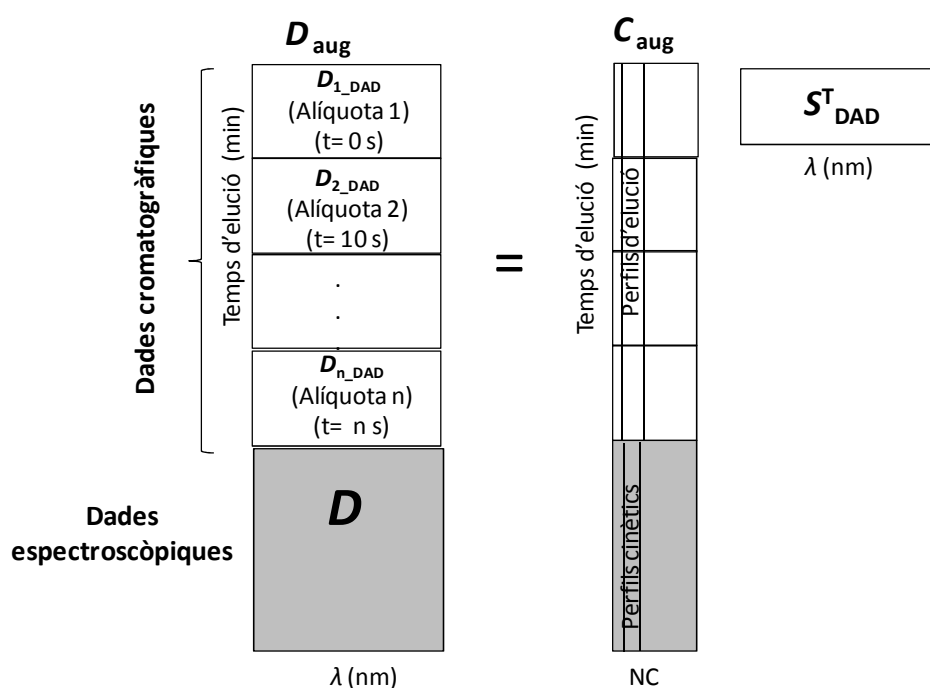


Figura 5.1-11. Acoblament del seguiment cromatogràfic amb el seguiment espectroscòpic.

Els casos idonis per a aplicar aquest acoblament espectroscòpic/cromatogràfic són aquells processos en què s'han pogut identificar tots els compostos i es té un coneixement mínim sobre la química del sistema, ja que permeten la postulació d'un mecanisme cinètic fiable. D'aquesta manera, es pot aplicar HS-MCR utilitzant la restricció de model cinètic en l'experiment d'espectroscòpia i modelar de forma flexible els perfils d'elució procedents del seguiment cromatogràfic. Com a resultat de la introducció de la restricció de model cinètic, s'obté una solució més robusta i fiable amb menys ambigüitat i les constants de velocitat reals del procés (no aparents) amb els seus errors associats.

Si no es tingués un coneixement prou sòlid sobre la identitat dels fotoproductes i la química associada al procés de fotodegradació, les dades espectroscòpiques es podrien ajustar a una enorme quantitat de models possibles i no hi hauria raons de pes suficients per a triar un d'ells sobre la resta. En aquestes situacions, la modelització flexible en l'anàlisi de l'acoblament espectroscòpic/cromatogràfic és la millor alternativa per a la interpretació i la descripció del procés en estudi.

Seguidament, a la Figura 5.1-12 es mostra, en forma d'esquema resum, el protocol a seguir per a la descripció d'un procés de fotodegradació. Aquest protocol d'anàlisi seguirà una via o una altra en funció de la complexitat intrínseca de les reaccions que tenen lloc, del nombre de fotoproductes formats i de la capacitat d'identificar-los i del coneixement previ que es tingui sobre la química associada al procés.

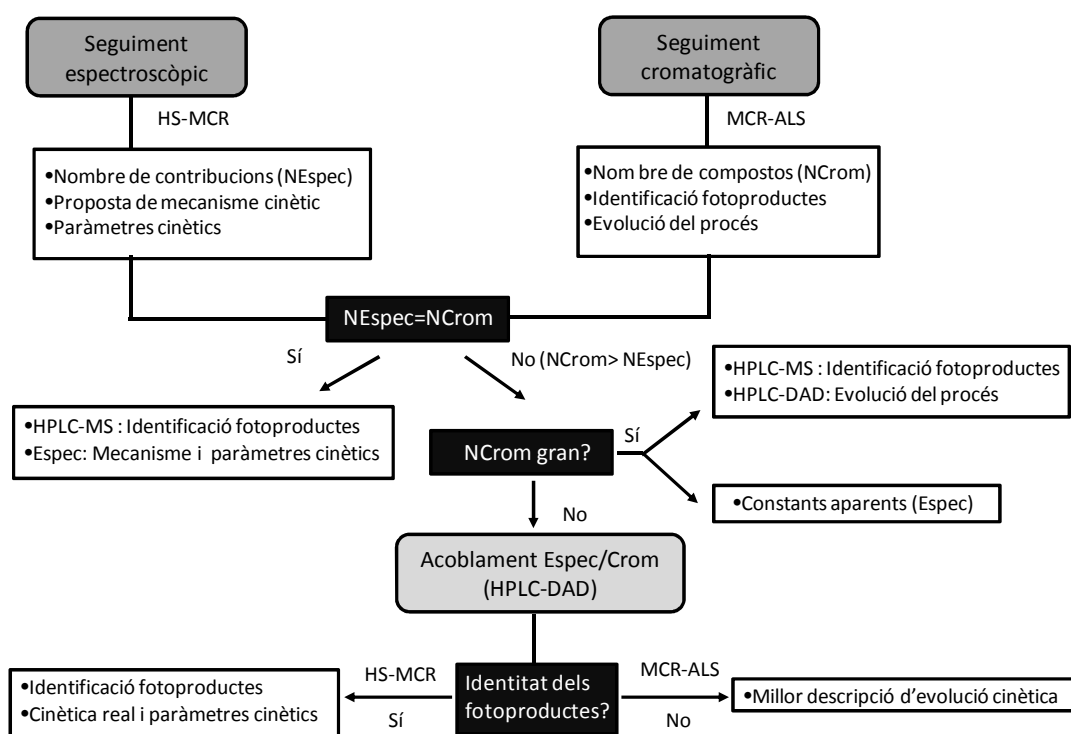
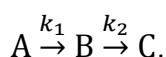


Figura 5.1-12. Esquema metodològic per a l'estudi de processos de fotodegradació.

A continuació, es mostren les capacitats de la metodologia proposada en aquest treball mitjançant el cas real de la fotodegradació del ketoprofèn. El ketoprofèn ha estat escollit perquè és un sistema simple en el qual hi ha poques espècies involucrades i, a més a més, se'n té un coneixement bàsic de la fotoquímica. Per tant es pot demostrar la utilitat de les dues estratègies d'acoblament anteriorment esmentades: (a) acoblament dels cromatogrames dels dos sistemes de detecció (DAD-MS) i (b) acoblament de les dades espectroscòpiques i cromatogràfiques. L'estudi de la degradació del ketoprofèn segueix, doncs, les etapes que tot seguit es descriuen.

Seguiment cinètic espectroscòpic de la otodegradació del ketoprofèn

En l'anàlisi exploratòria de les dades de seguiment espectroscòpic mitjançant MCR-ALS, en la qual es van aplicar les restriccions de no negativitat (matrius C i S^T), unimodalitat (matriu C) i normalització d'espectres, s'observa que es poden modelar tres contribucions (vegeu perfils de concentració i espectrals de la Figura 2-b de l'article 5.1-II). S'obté un resultat amb un percentatge de variància explicada superior al 99 %. Resolucions amb un nombre inferior o superior d'espècies no donen resultats millors ni més interpretables. A partir dels perfils de concentració resolts, es pot suggerir el següent mecanisme:



Posteriorment, les dades s'analitzen amb HS-MCR (vegeu perfils de concentració i espectrals en la Figura 2-c de l'article 5.1-II) forçant els perfils de concentració a seguir els models anteriorment esmentats i s'obtenen les següents constants de fotodegradació amb els seus errors associats $k_1 = 0.0444 \pm 0,0007$ i $k_2 = 0.00286 \pm 0,00002$. En aquest cas la variància explicada supera el 99%, la qual cosa indica la validesa del mecanisme escollit.

A partir d'aquests resultats veiem que la degradació del ketoprofèn sota l'acció de la llum UV és molt ràpida, tal i com ja han observat altres autors [Borsarelli, 2000; Martínez, 1997; Bosca, 1994]. No obstant això, Bosca i col·laboradors [Bosca, 1994] van descriure la fotodegradació del ketoprofèn amb la formació de més de dos fotoproductes. Per tant, sembla que es troba en el cas que el nombre de contribucions modelades és inferior al nombre d'espècies químiques involucrades en el sistema. Això és a causa de que aquestes espècies presenten una evolució cinètica idèntica o espectres purs

molt semblants. A continuació es presenten els resultats dels experiments de seguiment cromatogràfic, que confirmen la hipòtesi plantejada.

Seguiment cinètic per cromatografia de l'experiment de fotodegradació del ketoprofèn

En els experiments amb seguiment cromatogràfic s'injecten alíquotes de solució del ketoprofèn extretes mentre té lloc el procés de degradació. Les alíquotes corresponen a temps de procés diferents. En l'anàlisi d'aquest tipus d'experiment, ja s'ha comentat que es perdrà informació cinètica respecte a l'anàlisi del seguiment per absorció molecular, però també es podran resoldre més compostos o espècies químiques si hi són, a causa de que s'aprofita la separació cromatogràfica (els diferents perfils d'elució entre components) per a distingir entre espècies amb cinètiques o espectres molt semblants.

L'anàlisi dels experiments de fotodegradació es realitza mitjançant la resolució de la matriu augmentada, que conté tots els cromatogrames obtinguts en els diferents temps de procés, tal i com ja s'ha comentat anteriorment. A més també s'inclou una matriu corresponent al blanc del dissolvent. Les restriccions aplicades han estat no negativitat (a la matriu \mathbf{S}^T i la matriu \mathbf{C}) i unimodalitat en la direcció de les concentracions. Aquesta darrera restricció no s'aplica a la submatriu corresponent al cromatograma del blanc. També s'ha aplicat la restricció de selectivitat o rang local per a indicar l'absència d'alguns components en alguns intervals de temps d'elució. Els espectres purs s'han normalitzat. Per últim, com es treballa amb una matriu augmentada, s'ha utilitzat la restricció de la correspondència d'espècies (vegeu secció 4.4.2.4). En aquest cas, s'utilitza el fet que en el cromatograma a temps zero

només apareixen el ketoprofèn i la contribució del blanc i que el cromatograma del blanc només conté aquesta contribució. A la resta de cromatogrames, s'assumeix que potencialment pot existir qualsevol component.

La Taula 5.1-1 recull la qualitat de l'ajust en resoldre les dades de HPLC-DAD i de HPLC-MS per separat en funció del nombre de components.

Taula 5.1-1. Percentatge de manca d'ajust de les anàlisis de dades de HPLC-DAD i HPLC-MS en funció del nombre de components.

Nombre de components	% Manca d'ajust	
	HPLC-DAD	HPLC-MS
4	11,75	
5	8,90	14,09
6	9,32	8,67
7		7,83

En aquesta taula es pot observar que en resoldre l'experiment cromatogràfic s'han pogut modelar fins a 5 o 6 components. Aquest resultat ja posa de manifest que amb el seguiment per absorció molecular no s'han pogut resoldre totes les espècies presents ja que deuen tenir una evolució cinètica semblant o un espectre UV molt similar. Cal recordar que un dels components modelats pertany a la contribució del blanc.

A partir de la resolució individual de les dades HPLC-DAD és difícil triar entre 5 o 6 components (quatre o cinc espècies químiques i una contribució del

blanc) degut a que les dues resolucions presenten un ajust de les dades molt similars i uns perfils d'elució i espectrals bastant fiables i interpretables.

La Figura 5.1-13 mostra la resolució de les dades de HPLC-DAD amb 6 components i es pot observar com els compostos [A] [B] [D] i [E] presenten perfils espectrals molt similars, la qual cosa explica que no fossin espècies fàcilment distingibles en l'experiment espectroscòpic, on totes les espècies es troben simultàniament a la solució de mesura. Les diferències en el comportament d'elució ajuden a distingir les espècies involucrades en el procés de fotodegradació. Cal remarcar que els compostos [B] i [D] presenten uns perfils espectrals molt similars i es troben gairebé coeluits, la qual cosa fa difícil deduir entre el resultat de MCR-ALS amb 5 o 6 components.

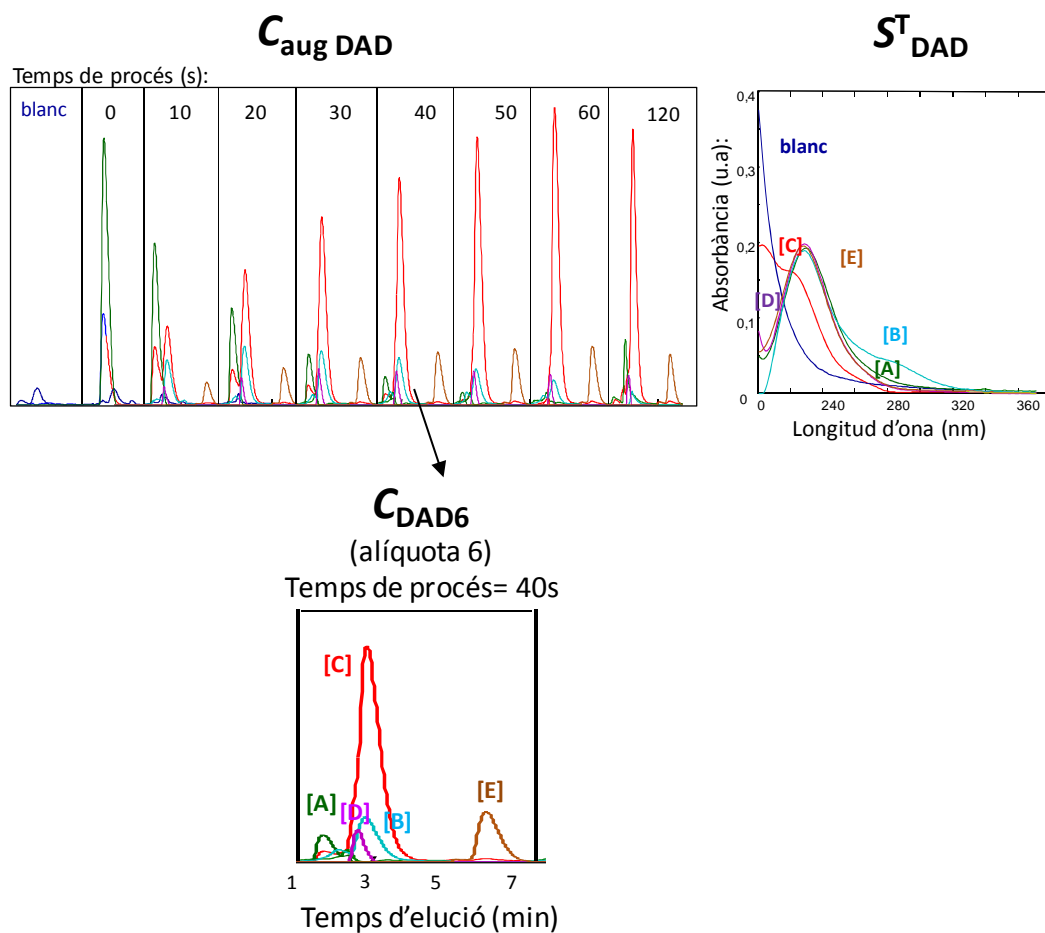


Figura 5.1-13. Perfils d'elució i espectrals resultats de l'experiment de fotodegradació del ketoprofèn amb 6 components. Vista ampliada dels perfils d'elució del cromatograma corresponent al temps de procés 40 segons.

Per a la resolució de les dades de HPLC-MS es necessiten sis components (cinc espècies químiques i una contribució del blanc) per a poder descriure el sistema. La incorporació d'un component addicional millora l'ajust de les dades, però l'espectre associat no té significat químic. En la Figura 5.1-14 es mostra la resolució de les dades de HPLC-MS amb 6 components amb les estructures proposades a partir dels espectres de MS resultats (matriu S^T).

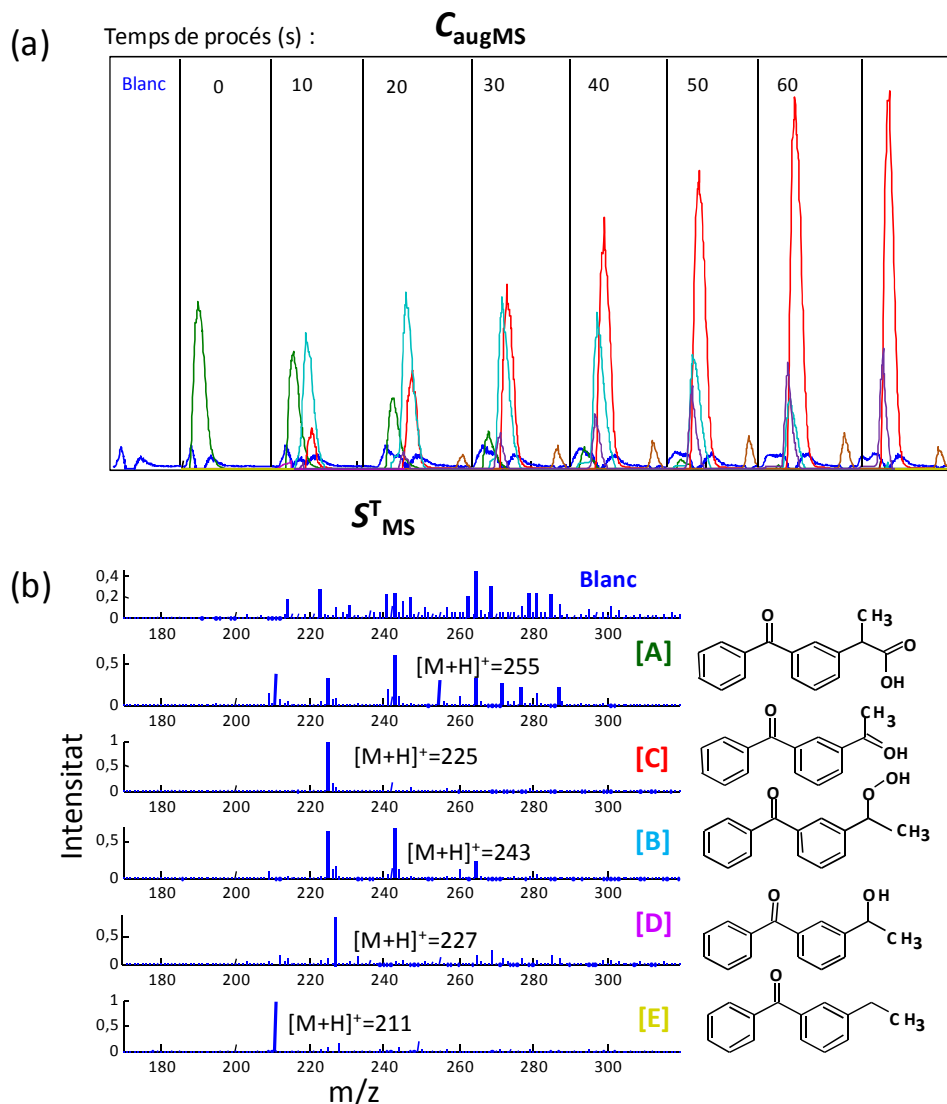


Figura 5.1-14. Perfils d'elució (a) i Espectres de MS (b) resolts per a l'experiment de fotodegradació del ketoprofèn [A] amb 6 components. Proposta de possibles estructures dels productes.

En aquest cas, els resultats de les anàlisis de dades HPLC-DAD i HPLC-MS semblen indicar la presència de 6 components (5 espècies químiques i la contribució del blanc). A més, la correspondència entre els components resolts ambdós sistemes de detecció és bona, ja que apareixen a temps de retenció similars i mostren molta semblança en l'evolució dels perfils d'elució.

Per tant, és possible l'acoblament de les dades HPLC-DAD i HPLC-MS per a aquest sistema químic.

Amb l'acoblament HPLC-DAD-MS s'aconsegueix que la solució obtinguda sigui de major qualitat. Les característiques espectrals de la doble detecció (DAD-MS) ajuden a diferenciar els compostos que es troben coeluits. D'aquesta manera, es pot veure que aquesta estratègia aconsegueix modelar correctament els sis components, que corresponen a cinc espècies químiques i una contribució de soroll de fons (blanc) (vegeu la Figura 3 de l'article 5.1-II).

A partir dels espectres de MS resolts i amb informació bibliogràfica [Borsarelli, 2000; Martínez, 1997; Boscó, 1994; Constanzo, 1989; Nakajima, 2005; Monti, 1997] es poden identificar tots els productes de degradació (vegeu Figura 5.1-14). D'aquesta manera es pot veure que el Ketoprofèn **[A]** sota la irradiació de la llum dona la formació de 3-(1-hidroperoxietil)benzofenona ($[M+H]^+=243$, **[B]**), 3-acetilbenzofenona ($[M+H]^+=224$, **[C]**), 3-(1-hidroxietil)benzofenona ($[M+H]^+=227$, **[D]**) i 3-etilbenzofenona ($[M+H]^+=211$, **[E]**). Els fotoproductes **[B]** i **[D]** han estat descrits a la bibliografia com els responsables de la fototoxicitat del ketoprofèn [Chignell, 1998; Lhiaubet, 2001; Boscó, 1994,1995; Constanzo, 1989].

A més, com s'ha comentat anteriorment, la representació de l'àrea de pic dels diferents compostos en funció del temps de procés proporciona informació cinètica (vegeu Figura 5.1-15).

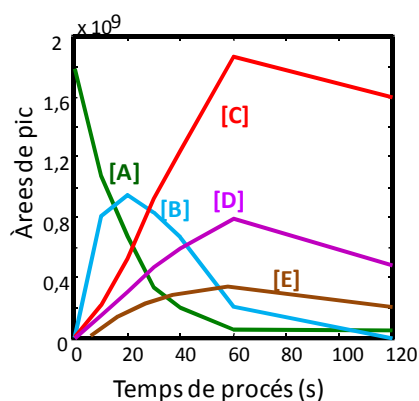


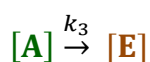
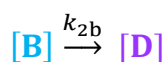
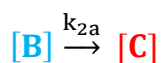
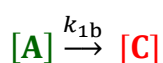
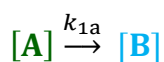
Figura 5.1-15. Representació de les àrees de pic dels compostos resoltos en funció del temps de procés per a la resolució de l'acoblament HPLC-DAD-MS.

A partir d'aquesta representació s'observa que el ketoprofèn es degrada totalment en l'interval de temps de l'experiment, la qual cosa està amb consonància amb l'alta velocitat de degradació que es veu en els resultats obtinguts per espectroscòpia d'absorció molecular. A més, es detecta l'aparició d'un producte intermedi ([B]) i tres productes finals ([D], [C] i [E]). Aquests tres productes finals segueixen una evolució cinètica molt semblant. Aquest fet, juntament amb la semblança entre els seus espectres d'absorció molecular, explica que el nombre d'espècies modelat en l'experiment per seguiment espectroscòpic fos menor.

Boscá i col·laboradors [Boscá, 1997] van suggerir que en la fotodegradació del ketoprofèn al pH de treball es dona una descarboxilació via dos intermedis radicalaris que no es poden detectar en l'escala de temps de treball utilitzada en l'experiment realitzat. Un radical carbaní benzílic dona la formació del producte [E], mentre que la formació de [D], [C] i [B] l'associen a l'oxigenació d'un radical benzílic. Aquest fet i la forma dels perfils cinètics

obtinguts fa suggerir una proposta de model cinètic en què la formació de [E] succeeix independentment dels productes [D], [C] i [B].

Per tant, tenint en compte la forma dels perfils cinètics, la identitat dels fotoproductes formats i la bibliografia esmentada es pot proposar el mecanisme següent:



Cal recordar que amb l'anàlisi cromatogràfica es té una baixa definició de l'eix de temps de procés. A més, aquest és en un cas simple amb poques espècies involucrades en el sistema i en què el nombre de compostos resolts en l'experiment espectroscòpic no difereix massa del de l'experiment cromatogràfic. Per tant, per a proporcionar una descripció més completa de la cinètica es proposa la fusió de les dades cromatogràfiques amb les espectroscòpiques.

Anàlisi de l'acoblament de les dades espectroscòpiques i cromatogràfiques de l'experiment de fotodegradació del ketoprofen

Com s'ha vist, els experiments per seguiment espectroscòpic donen una molt bona definició dels temps de procés, però no permeten per si sols modelar totes les espècies del sistema, ja que algunes d'elles tenen una evolució cinètica o uns espectres purs massa semblants. D'altra banda, els experiments cromatogràfics permeten una diferenciació d'espècies més gran perquè elueixen de forma diferent, però la informació cinètica del procés queda molt reduïda perquè molts pocs temps de procés són analitzats (tants com cromatogrames). La fusió de les dades cromatogràfiques amb les espectroscòpiques combinarà els avantatges dels dos experiments i ens disminuirà les limitacions que presenten cadascun d'ells per separat.

A continuació es presenten els resultats de l'anàlisi simultània de les dades de l'experiment cromatogràfic amb detecció DAD amb les dades de l'experiment per seguiment espectroscòpic. Per tal de poder acoblar les dades dels dos tipus d'experiment, s'ha hagut de treballar a un interval de longituds d'ona de treball útil i comú als dos tipus d'experiment.

Primerament, la resolució de les dades s'ha fet amb MCR-ALS. Com a estimacions inicials hem utilitzat els espectres resolts d'UV en l'anàlisi de l'acoblament de les dades HPLC-DAD-MS. S'han aplicat les restriccions de no negativitat en la direcció de les concentracions i dels espectres i unimodalitat en la direcció de les concentracions (totes les espècies exceptuant la contribució del blanc) i normalització d'espectres. La matriu de correspondència entre espècies s'ha aplicat com s'explicava en la secció de seguiment cromatogràfic, fixant l'única presència de l'espècie inicial en el

cromatograma a temps=0. La Figura 5.1-16 mostra els resultats obtinguts, en què s'han pogut resoldre 6 espècies. En aquest cas, també es va obtenir un resultat amb un percentatge de variància explicada superior al 99 %.

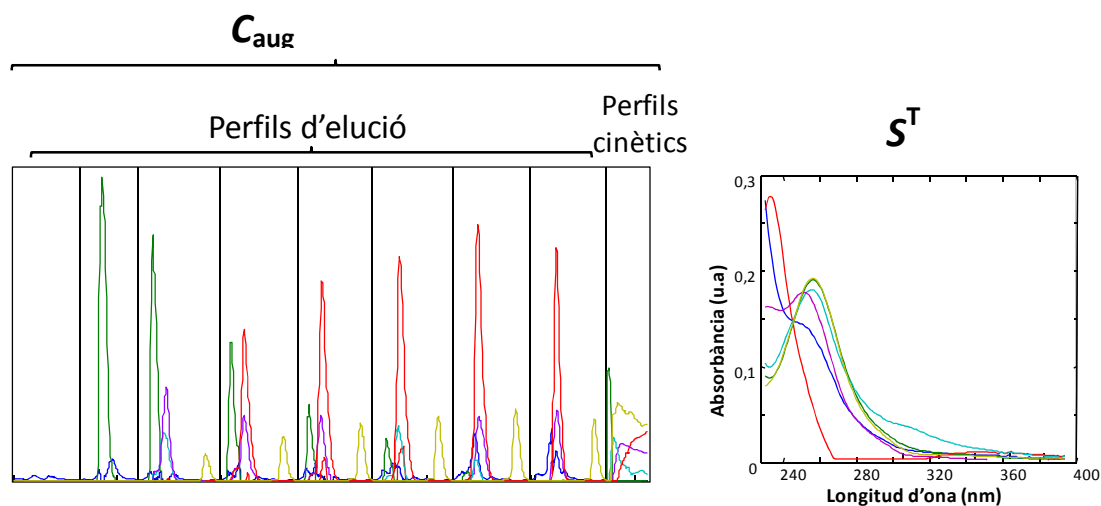


Figura 5.1-16. Perfils de concentració i espectres resolts per a l'anàlisi amb MCR-ALS de l'acoblament de dades cromatogràfiques i espectroscòpiques.

Com es pot comprovar, ara és possible distingir en l'experiment espectroscòpic un nombre superior d'espècies a l'obtingut quan aquest experiment es tractava independentment. Això és causa de la informació addicional que aporten les dades cromatogràfiques per a distingir entre components. Per tant, amb l'acoblament de les dues tècniques es 'trenca' la deficiència de rang que presenten les dades espectroscòpiques.

En la següent figura es comparen l'evolució de les àrees de pic i les concentracions de l'experiment de seguiment espectroscòpic.

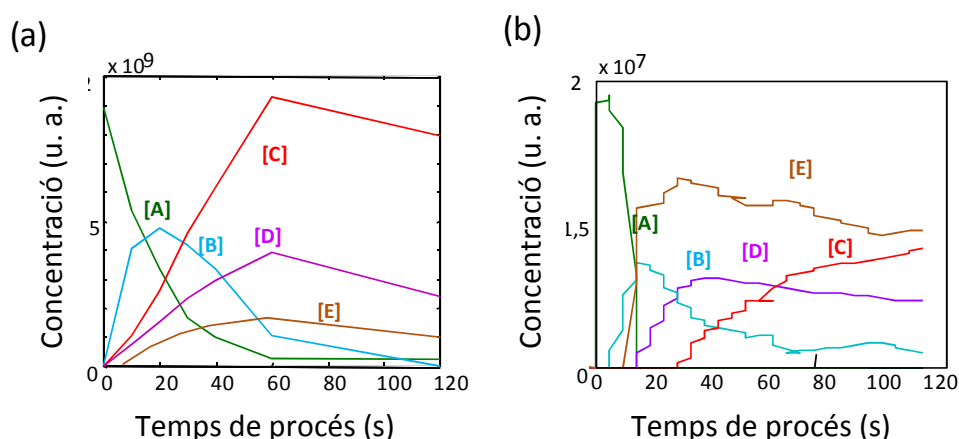
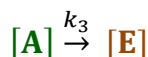


Figura 5.1-17. Representació dels perfils cinètics resolts procedents (a) de l'evolució de les àrees de pic en funció del temps de procés i (b) de l'experiment espectroscòpic.

S'observa que l'evolució de les diferents espècies guarda similituds entre les dues figures. A més, aquest és un cas en què es coneix la identitat dels fotoproductes i es té un coneixement previ sobre la cinètica de fotodegradació del ketoprofèn. Per tant, es pot considerar la inclusió de models cinètics que expliquin de forma més correcta el procés de fotodegradació del ketoprofèn.

Es produeix, doncs, a l'aplicació del mètode HS-MCR a l'acoblament de dades espectroscòpiques i cromatogràfiques. En aquest cas, els perfils d'elució del seguiment cromatogràfic es modelen de forma flexible; en canvi, en l'experiment de seguiment espectroscòpic, els perfils de concentració s'ajusten al model cinètic anteriorment proposat.

Amb la finalitat d'ajustar bé les dades i a causa de la similitud entre k_{1a} i k_{1b} i k_{2a} i k_{2b} , en lloc de prendre el model proposat anteriorment en la secció del seguiment cromatogràfic, els perfils cinètics es van ajustar a un model equivalent a l'anterior, que es formula com:



on k_1 i k_2 són constants aparents que representen les equacions paral·leles:

$[\text{A}] \xrightarrow{k_{1a}} [\text{B}]$ i $[\text{A}] \xrightarrow{k_{1b}} [\text{C}]$ i $[\text{B}] \xrightarrow{k_{2a}} [\text{C}]$ i $[\text{B}] \xrightarrow{k_{2b}} [\text{D}]$, respectivament. Cal remarcar que les constants k_{1a} i k_{1b} són iguals; per tant, utilitzar una única k aparent per a definir les dues constants fa més fàcil l'ajust de les dades. El mateix passa amb les constants k_{2a} i k_{2b} .

La figura 5.1-18 mostra els perfils de concentració i espectrals obtinguts. Es pot observar com els perfils d'elució i espectrals resolts concorden força amb els obtinguts en la resolució amb modelització flexible i en l'acoblament de les dades de HPLC-DAD-MS. En aquest cas la variància explicada també supera el 99 %. Tots aquests fets indiquen la validesa del mecanisme escollit. Com a resultat de la introducció de la restricció de model cinètic, s'obté una solució amb menys ambigüitat, uns perfils cinètics molt ben definits i les següents constants de velocitat del procés: $k_1=0,058 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$, $k_2=0,0104 \pm 0,0006 \text{ s}^{-1}$ i $k_3=0,030 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$.

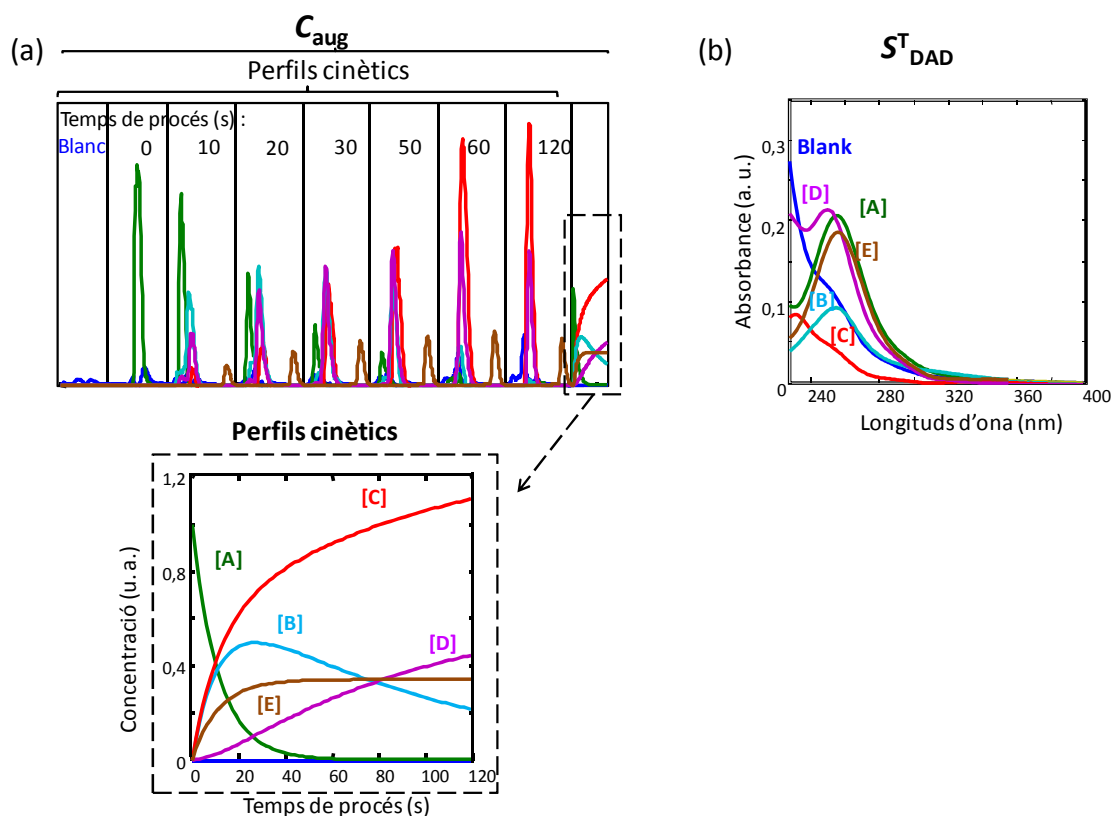


Figura 5.1-18. Perfils de concentració i espectres resolts per a l'anàlisi amb HS-MCR de l'acoblament de dades cromatogràfiques i espectroscòpiques.

Els resultats de l'anàlisi de l'acoblament espectroscòpic/cromatogràfic i de les dades fusionades HPLC-DAD-MS confirmen que la formació paral·lela d'alcohols, peròxids i cetones és la principal via de fotodegradació del ketoprofèn i alerta sobre els efectes adversos de la fotosensibilitat d'aquest fàrmac.

En resum, a partir d'aquest treball es pot concloure que:

- La degradació del ketoprofèn sota l'acció de la llum és un procés molt ràpid.
- La descarboxilació fotolítica de ketoprofèn, formant de manera paral·lela 3-acetilbenzofenona, 3-etilbenzofenona, 3-(1-hidroxietil)benzofenona i

3-(1-hidroperoxietil)benzofenona és la principal via de fotodegradació del ketoprofèn.

- L'ús dels acoblaments (HPLC-DAD/DAD i HPLC-DAD-MS) i de MCR-ALS i HS-MCR és una eina poderosa per a l'estudi general de processos de fotodegradació. Aquests acoblaments permeten obtenir una descripció completa de la cinètica dels processos de fotodegradació amb totes els passos successius, constants cinètiques i fotoproductes formats.

5.1.2. BIBLIOGRAFIA

[Amrhein, 1996]

M. Amrhein, B. Srinivasan, D. Bonvin, M.M. Schumacher. *On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 33 (1996) 17.

[Booksh, 1994]

K. Booksh; B R. Kowalski. *Theory of analytical chemistry*. Anal. Chem. 66 (1994) 782A.

[Borsarelli, 2000]

C.D. Borsarelli, S.E. Braslavsky, S. Sortino, G. Marconi, S. Monti. *Photodecarboxylation of Ketoprofen in Aqueous Solution. A Time-resolved Laser-induced Optoacoustic Study*. Photochem. Photobiol 72 (2000) 163.

[Boscá, 1994]

F. Boscá, M.A. Miranda, G. Carganico, D. Mauleón. *Photochemical and photobiological properties of ketoprofen associated with the benzophenone chromophore*. Photochem. Photobiol. 60 (1994) 96.

[Boscá, 1995]

F. Boscá, M.A. Miranda, G. Carganico, D. Mauleón. *Evaluation of ketoprofen (R, S and View the MathML source) phototoxicity by a battery of in vitro assays*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 3 (1995) 133.

[Bro, 1997]

R. Bro, PARAFAC. *Tutorial and applications*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 38 (1997) 149.

[Brunet, 2009]

D. Brunet; T. Woignier; M. Lesueur-Jannoyer; R. Achard; L. Rangon; B.G. Barthès. *Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)*. Environ. Pollut. 157 (2009) 3120.

[Constanzo, 2005]

L.L. Constanzo, G. de Guidi, G. Condorelli, A. Cambria, M. Fama. *Molecular mechanism of drug photosensitization—ii. photohemolysis sensitized by ketoprofen*. Photochem. Photobiol. 50 (1989) 359.

[Geladi, 1986]

P. Geladi, B. R. Kowalski. *Partial least-squares regression: a tutorial*. Anal. Chem. 185 (1986) 1.

[Goldberg, 1989]

D.E. Goldberg, *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*, Addison-Wesley, New York, USA, 1989.

[Chignell, 1998]

C.F. Chignell, R.H. Sik. *The Effect of Static Magnetic Fields on the Photohemolysis of Human Erythrocytes by Ketoprofen*. Photochem. Photobiol. 67 (1998) 591.

[Haykin, 1999]

S. Haykin, *Neural Networks. A Comprehensive Foundation*, 2nd ed., Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 1999.

[Henry, 2003]

R. C. Henry. *Multivariate receptor modeling by N-dimensional edge detection*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 65 (2003) 179.

[Izquierdo-Ridorsa, 1997]

A. Izquierdo-Ridorsa, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler. *Second order multivariate curve resolution applied to rank deficient data obtained from acid-base spectrometric titrations of mixtures of nucleic bases*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 38 (1997) 193.

[de Juan, 2009]

A. de Juan, S.C. Rutan, M. Maeder, R. Tauler. *MCR Capítols en*: D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier: Amsterdam, 2009, pp. 207-558

[Lhiaubet, 2001]

V. Lhiaubet, N. Paillous, N. Chouini-Lalanne. *Comparison of DNA Damage Photoinduced by Ketoprofen, Fenofibric Acid and Benzophenone via Electron and Energy Transfer*. Photochem. Photobiol. 74 (2001), 670.

[Martínez, 1997]

L.J. Martínez, J.C. Scaiano. *Transient Intermediates in the Laser Flash Photolysis of Ketoprofen in Aqueous Solutions: Unusual Photochemistry for the Benzophenone Chromophore*. J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 11066.

[Monti, 1997]

S. Monti, S. Sortino, G. de Guidi, G. Marconi. *Photochemistry of 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid(ketoprofen) Part 1A picosecond and nanosecond time resolved study inaqueous solution*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 93 (1997) 2269.

[Nahorniak, 2003]

M. L.Nahorniak, K. S. Booksh. *Optimizing the implementation of the PARAFAC method for near-real time calibration of excitation–emission fluorescence analysis*. J. Chemometrics 17 (2003) 608.

[Paatero, 1994]

P. Paatero, U. Tapper. *Positive matrix factorization: A non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values*. Environmetrics 5 (1994) 111.

[Paatero, 1999]

P. Paatero. *The multilinear engine-A table-driven least squares program for solving multilinear problems, including the n-way parallel factor analysis model*. J. Comput. Graph. Stat. 8 (1999) 854.

[Peré-Trepat, 2006a]

E. Peré-Trepat, L. Olivella, A. Ginebreda, J. Caixach, R. Tauler. *Chemometrics modelling of organic contaminants in fish and sediment river samples*. Sci. Total Environ. 371 (2006) 223.

[Peré-Trepat, 2006b]

E. Peré-Trepat, R. Tauler. *Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography–diode array detection mass spectrometry data*. J Chromatogr. A 1131 (2006) 85.

[Salau, 1997]

J.S. Salau, R. Tauler, J. M. Bayona, I. Tolosa. *Input Characterization of Sedimentary Organic Contaminants and Molecular Markers in the Northwestern Mediterranean Sea by Exploratory Data Analysis*. Environ. Sci. Technol. 31 (1997) 3482.

[Schalkoff, 1992]

R. Schalkoff. *Pattern Recognition Statistical, Structural and Neural Approaches*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1992.

[Tauler, 1995]

R. Tauler. *Multivariate curve resolution applied to second order data*. Chemom. Intell. Lab. Sys.30 (1995) 133.

[Tauler, 2000]

R. Tauler, D. Barcelo, E. M. Thurman. *Multivariate Correlation between Concentrations of Selected Herbicides and Derivatives in Outflows from Selected U.S. Midwestern Reservoirs*. Environ. Sci. Technol.34 (2000) 3307.

[Tauler, 2001]

R. Tauler, D.D.A Azevedo, S. Lacorte, R. Céspedes, P. Viana, D. Barceló. *Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal Using Chemometric Interpretation*. Environ. Technol. 22 (2001) 1043.

[Tucker, 1972]

L. R. Tucker. *Relations between multidimensional scaling and three-mode factor analysis*. Psychometrika 37 (1972) 3.

[Weisberg, 1985]

S. Weisberg. *Applied Linear Regression*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1985.

5.2. SEGUIMENT I INTERPRETACIÓ DE PROCESSOS DE DEGRADACIÓ DELS DIFENILÈTERS POLIBROMATS

En aquest apartat es mostren els articles que fan referència als estudis dels processos de fotodegradació i biodegradació del producte comercial DecaBDE i a la determinació analítica dels fotoproductes formats. El primer article presenta resultats de l'estudi de fotodegradació del DecaBDE mitjançant tècniques espectroscòpiques, cromatogràfiques i quimiomètriques. Els altres dos articles mostren els estudis relacionats amb els estudis de biodegradació. En un d'ells es proposa una nova metodologia d'anàlisi per a la determinació de possibles productes de biodegradació dels PBDEs (OH-PBDEs) i l'altre presenta l'estudi de biodegradació *in vitro* del DecaBDE mitjançant microsomes de fetge de rata.

5.2-I. Sílvia Mas, Anna de Juan, Sílvia Lacorte, Romà Tauler. *Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach*. Analytica Chimica Acta 618(2008) 18.

En aquest article s'ha estudiat la fotodegradació del producte comercial DecaBDE mitjançant un seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular per tal de descriure l'evolució del procés i investigar la potencial formació de congèneres amb un nombre més petit de broms o d'altres productes de fotodegradació. Atesa la baixa solubilitat d'aquest compost i amb la finalitat d'estudiar l'efecte de la polaritat en la cinètica de degradació, s'han dut a terme els experiments utilitzant com a solvent diferents mesclures hidroorgàniques. S'ha aplicat el mètode de resolució multivariant de dades de modelització híbrida (rígid i flexible), HS-MCR, per a la resolució dels perfils

de concentració i dels espectres purs de les espècies formades, així com per a avaluar els paràmetres cinètics del procés de fotodegradació. Per altra banda, s'han iniciat simultàniament estudis de caracterització dels productes de degradació mitjançant GC-MS. Com a resultat s'obté una descripció detallada del procés de fotodegradació del DecaBDE, que inclou la proposta d'un mecanisme amb etapes cinètiques successives i la detecció i la identificació d'un gran nombre de fotoproductes.

5.2-II. Sílvia Mas, Olga Jáuregui, Fernando Rubio, Anna de Juan, Romà Tauler, Sílvia Lacorte. ***Comprehensive liquid chromatography–ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices.*** Journal of mass spectrometry 2007 (42) 890.

En aquest treball s'ha establert una nova metodologia d'anàlisi mitjançant HPLC-ISP-MS/MS per a vuit PBDEs hidroxilats. Els PBDEs hidroxilats són possibles productes de biodegradació dels PBDEs. Aquesta metodologia de determinació directa es presenta com a alternativa a les metodologies d'anàlisi mitjançant GC-MS amb derivatització dels compostos prèvia a la seva injecció.

5.2-III. Sílvia Mas, Demetrio Raldúa, Anna de Juan, Romà Tauler, Sílvia Lacorte. ***In vitro metabolism of decabromo diphenyl ether using rat microsomes.*** Organohalogen Compounds 70 (2008) 2189.

En aquest treball s'ha estudiat la biotransformació *in vitro* del producte comercial DecaBDE per l'acció de microsomes de fetge de rata als quals se'ls ha induït els enzims CYP1A, CYP2B i CYP3A4. S'ha pogut detectar una disminució de la quantitat del DecaBDE, la qual cosa significa que es produeix una biotransformació. Per tal de determinar els possibles productes de

degradació i d'aquesta manera avaluar la desbromació o els processos d'hidroxilació durant la degradació microsomal es va utilitzar GC-MS i la metodologia HPLC-MS/MS proposada en l'article 5.2-II.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach

Sílvia Mas^{a,b}, Anna de Juan^b, Sílvia Lacorte^a, Romà Tauler^{a,*}

^a Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2008

Received in revised form

11 April 2008

Accepted 14 April 2008

Published on line 25 April 2008

Keywords:

Decabromodiphenyl ether

Photodegradation process

Rate constants

Kinetic model

Hard- and soft-modelling

multivariate curve resolution

ABSTRACT

This work presents an exploratory study of the photochemical degradation process of decabromodiphenyl ether (decaBDE) and gives an interpretation of the kinetic pathway, species and effects of the key factors involved in the degradation process. Use of lowly brominated diphenyl ethers (PBDE) has been banned by the EU and there seems to be evidence of the photolytic degradation of highly brominated PBDEs into lowly brominated congeners. Hence, the importance of knowing the photodegradation process of decaBDE.

The photodegradation was investigated under UV light by UV-spectrophotometric monitoring. A novel hybrid data analysis approach, based on the combination of hard- and soft-spectrophotometric multivariate curve resolution, was applied to elucidate the mechanism of the degradation process, to resolve kinetic profiles and pure spectra of the photodegradation products and to evaluate the rate constants. The photodegradation process could be described with a kinetic model based on three consecutive first-order reactions and a decrease of the degradation process was observed as solvent polarity increased. Complementary identification of photodegradation products by gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative chemical ionization (GC-NCI-MS) is attempted.

This work presents a novel attempt of describing in a comprehensive way the photochemical degradation process of decaBDE, with all successive steps and related rate constants. This study proves also the potential of the proposed hybrid data analysis methodology as a general strategy to interpret the evolution of these photochemical reactions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been extensively used as flame retardants and in a wide variety of products including plastics, textiles and electronics [1]. During the past years, concerns have arisen due to the increasing occurrence of these products in the environment and to the proven toxic and endocrine disruptor activity of lowly

brominated congeners [2]. This concern has led the European Union to ban the commercial pentaBDE and octaBDE formulation [1,3]. As a consequence, decabromodiphenyl ether (decaBDE) is the only PBDE of worldwide accepted use; however, lowly brominated congeners of forbidden use (tetraBDE and pentaBDE) are still the most commonly found in the environment. This fact connects with the evidence that higher congeners can degrade by the action of light into lower

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 61 40; fax: +34 93 204 59 04.

E-mail addresses: rtaqam@cid.csic.es, taqam@iiqab.csic.es (R. Tauler).
0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2008.04.044

congeners in the environment. Hence, the interest in understanding the photodegradation process of decaBDE.

Several studies have proven that decaBDE can be fragmented by UV light and direct sunlight under a variety of conditions [4–18]. In this reaction, the energy from the light dislodges bromine from the diphenyl ether backbone, creating PBDE congeners with fewer bromine atoms and, potentially, other brominated compounds, such as brominated dibenzofurans (PBDFs) [4,6,8,17]. This reaction is faster when decaBDE is present in organic solvents and slower when in water. According to these studies, photolytic debromination could be a reason for the relative dominance of lowly brominated PBDEs in the environment.

Only few studies have estimated the rate or extent of PBDEs photochemical reactions. The so-called photodegradation rate (k), defined as the rate constant linked to the decay of a particular PBDE compound, is a characteristic parameter of these photochemical reactions and has been widely used to understand the fate of PBDEs in the environment [8,10,11,13,14]. It is important to note that the studies performed so far are focused on the description of the single step of photodecay of a particular PBDE compound, described by the photodegradation rate, but do not investigate either the potential successive degradation steps that may take place if the process goes forward or the complete photodegradation mechanism. Obtaining this information and providing the necessary methodology for this purpose has been the main goal of the present study.

Photodegradation processes are often monitored in the laboratory by means of UV spectroscopy, where a series of spectra is collected as a function of time. Changes in absorption bands as the photodegradation takes place enclose all the information needed to describe the evolution of the process under study. However, raw measurements provided by UV absorption are unresolved and, most often, no selective wavelengths are expected to be present. To solve this problem, mathematical resolution can be applied. A recently developed hybrid hard- and soft-modelling multivariate curve resolution (HS-MCR) approach has been successfully applied to resolve kinetic processes monitored spectroscopically [19,20]. This method combines the qualities of deterministic (rate law) hard-modelling and self or soft-modelling methods (no physicochemical law assumption), allowing the simultaneous treatment of several experiments performed in different conditions with different kinetic models and rate constants.

In this work, the photolytic debromination of decaBDE has been monitored by UV spectroscopy. Due to the low solubility of decaBDE in water, photolysis experiments were carried out in tetrahydrofuran hydroorganic mixtures. In order to evaluate the effect of solvent polarity on the degradation rate, several solvent compositions were used. Once this effect was understood, conclusions were inferred on the development of the process in the aqueous environmental medium. The proposed HS-MCR approach was applied to elucidate the mechanism of the degradation process, to resolve kinetic concentration profiles and pure spectra of the resulting photodegradation products and to obtain the related rate constants. Due to the flexibility in the incorporation of kinetic model information, simultaneous analysis of experiments at different solvent compositions, i.e., with different rate con-

stants and slightly different spectral shapes were also carried out. Complementary information about the possible identity of photodegradation compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative chemical ionization (GC-NCI-MS) is also presented.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical grade decabromodiphenyl ether (98%) was from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA), tetrahydrofuran from Merck (Darmstadt, Germany) and GC grade hexane from Merck. The polybrominated diphenyl ether analytical standard solutions EO-4980 and EO-5278 were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The components of the EO-4980 solution were three monoBDEs (BDE 1–3), seven diBDEs (BDE 7, 8, 10–13 and 15), eight triBDEs (BDE 17, 25, 28, 30, 32, 33, 35 and 37), six tetraBDEs (BDE 47, 49, 66, 71, 75 and 77), seven pentaBDEs (BDE 85, 99, 100, 105, 116, 119 and 126), six hexaBDEs (BDE 138, 140, 153–155 and 166) and three heptaBDEs (BDE 181, 183 and 190). The components of the EO-5278 solution were one triBDE (BDE 28), one tetraBDE (BDE 47), two pentaBDE (BDE 99 and 100), two hexaBDE (BDE 153 and 154), one heptaBDE (BDE 183) and the decaBDE (BDE 209).

2.2. Apparatus

2.2.1. UV experiments

Photodegradation of samples was induced using a UV lamp 254 nm/12 W from Vilber Lourmat (France). Spectrophotometric measurements were performed using an Agilent 8453 Diode Array spectrophotometer (G1103A).

2.2.2. GC-MS experiments

Gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative chemical ionization detection (GC-NCI-MS) was performed on an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Network mass spectrometer. An HP-5ms capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) containing 5% phenylmethyl siloxane (Model HP 19091S-433) was used with helium as the carrier gas at 10 psi and methane was used as reagent gas in the NCI mode. The temperature program was from 110 $^{\circ}$ C (held for 1 min) to 180 $^{\circ}$ C (held for 1 min) at 8 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, then from 180 to 240 $^{\circ}$ C (held for 5 min) at 2 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, and then from 240 to 280 $^{\circ}$ C (held for 6 min) at 2 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, using the splitless injection mode during 1 min. The ion source temperature and reagent gas pressure in the ion source were 250 $^{\circ}$ C and 2.7×10^{-4} Torr respectively.

2.3. Experimental procedure

2.3.1. UV experiments

A stock solution of decaBDE was prepared in tetrahydrofuran (THF) at a concentration of 600 mg L $^{-1}$. Working samples were diluted to 120 mg L $^{-1}$ in different THF–water mixtures (90:10, 80:20, 70:30 and 60:40, v/v). Due to the low solubility of decaBDE in water, mixtures with higher percentage of water could not be used. Both stock and working samples were stored in a

refrigerator at 4 °C in darkness and were used within 2 weeks of their preparation.

In order to work in the same experimental conditions, the first spectrum was always recorded immediately after the UV lamp was switched on. A blank of the solvent was registered at the beginning of each experiment. Three replicates for all solvent compositions were made to check the reproducibility of each photodegradation experiment and to obtain more reliable results.

Spectra were registered from 250 to 400 nm, with a resolution of 1 nm, every 30 s during 9 h. Each experiment provided a data table of spectra measured as a function of time. Recorded spectra were exported from the spectrophotometer into the suitable chemometric software.

2.3.2. GC–MS experiments

A decaBDE solution was prepared in tetrahydrofuran at a concentration of 120 mg L⁻¹. The sample was placed in a quartz bottle and was irradiated by the UV lamp. At different intervals of time, aliquots of 20 µL of the sample were collected, evaporated, reconstituted in hexane and analysed by GC–NCl–MS. Full scan data acquisition was performed by scanning from *m/z* 75 to 800. The whole kinetic process is defined by a series of GC–MS runs.

The standard solutions EO-4980 and EO-5278, containing identified mixtures of PBDEs, were also injected to be used in the identification of PBDEs involved in the kinetic process.

3. Chemometric methods

3.1. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS)

Every *k*th photodegradation experiment monitored spectroscopically gives a data matrix, D_k , which can be described

assuming a bilinear model based on the multiwavelength extension of Beer's law:

$$D_k = C_k S^T + E_k \quad (1)$$

where the rows of matrix D_k are the spectra collected at different reaction times and the columns are the kinetic traces recorded at different wavelengths. C_k is the matrix of the concentration profiles of the compounds involved in the *k*th kinetic process and S^T is the matrix of their related pure spectra. Finally, E_k is the residual matrix with the unmodelled data variance (Fig. 1a).

The main goal of multivariate curve resolution-alternating least squares is the determination of C_k and S^T matrices from the sole information of the experimental data matrix D_k [21,22].

First, the number of compounds present in the kinetic process is estimated from the “chemical rank” associated with the data matrix D_k . This determination is performed by Singular Value Decomposition (SVD) [23], knowing that singular values associated with chemical compounds are larger than singular values related to noise and to experimental error. Second, initial estimates of either S^T or C_k are obtained from techniques based on the detection of “purest” variables [24] or by means of evolving factor analysis (EFA) [25], respectively. These initial estimates are iteratively optimized by a constrained alternating least squares (ALS) regression procedure. At each iteration, new estimates of the matrix of spectra, S^T , and the matrix of concentration profiles, C_k , are obtained by solving alternatively the two least-squares matrix equations:

$$C_k = D_k (S^T)^+ \quad (2)$$

$$S^T = (C_k)^+ D_k \quad (3)$$

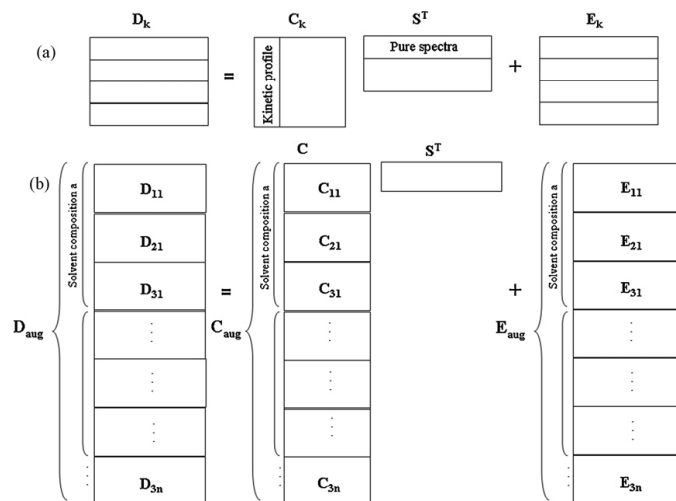


Fig. 1 – (a) Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) resolution applied to a single data matrix D_k (b) MCR-ALS resolution applied to the column-wise augmented data matrix D_{aug} . D_1 , D_2 and D_3 are the three replicates of each photodegradation experiment.

where $(S^T)^+$ and $(C_k)^+$ are the pseudoinverse of the S^T and C_k matrices, respectively [21]. The sequence of Eqs. (2) and (3) is valid when an S^T -type initial estimate is used. When working with C_k -type estimates, the sequence of equations in each iterative cycle is reversed. After each iterative cycle, a new reproduction of matrix D_k using S^T and C_k is obtained. Finally, when the convergence criterion is fulfilled, the optimization process is finished. The convergence criterion may be established by a preselected number of iterative cycles or, most often, can be based on the comparison of lack of fit values obtained in two consecutive iterations. The lack of fit is calculated according to the expression

$$\%LOF = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (4)$$

where d_{ij} is the experimental absorbance at reaction time i and wavelength j and d_{ij}^* is the absorbance obtained with the MCR-ALS model. When relative differences in fit among consecutive iterations are below a threshold value, the optimization is finished.

Another parameter used to indicate the fit quality of the MCR-ALS results is the percentage of explained variance (r^2), calculated according to the following equation:

$$r^2 (\%) = 100 \times \frac{\sum_{ij} d_{ij}^{2*}}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \quad (5)$$

An outstanding advantage of MCR-ALS is the possibility of working simultaneously with multiexperiment and/or multi-technique data structures. To do so, augmented data matrices in the column and/or in the row dimension are used [21]. In the context of the photodegradation experiments, the data analysis can be carried out simultaneously over several experiments at different solvent compositions, setting the corresponding data matrices D_k one on top of each other, forming a column-wise data matrix (Fig. 1b). The bilinear model in Eq. (1) is now extended to the augmented data set as shown in Eq. (6)

$$D = [D_1; D_2; \dots; D_N] = [C_1; C_2; \dots; C_N] S^T + E = CS^T + E \quad (6)$$

where C is a column-wise augmented matrix formed by the C_k submatrices that contain the resolved kinetic profiles in the different photodegradation experiments, and S^T is a single data matrix of pure spectra, assumed to be common and valid for all experiments.

No matter which kind of data arrangement is analysed, different soft-modelling constraints can be applied in each iteration of the ALS optimization [22]. The constraints applied to kinetic experiments are non-negativity (both concentration profiles and pure spectra of the resolved components must be positive), unimodality (concentration profiles in successive degradation processes present only one maximum per profile) and closure (mass balance in the concentration direction).

Different constraints can be applied to the profiles in the concentration direction (C_k) and in the spectral direction (S^T) and to the different chemical species within each of these two matrices. When a series of experiments is analysed simultane-

ously, the submatrices of the column-wise augmented matrix C can also be constrained independently.

3.2. Hybrid hard- and soft-modelling multivariate curve resolution-alternating least squares (HS-MCR)

The proposed hard-soft multivariate curve resolution (HS-MCR) is a modification of the iterative soft-modelling MCR-ALS that introduces a new hard-modelling constraint to force some or all the concentration profiles of the system to fulfill a kinetic model. In each iteration, the selected soft-modelled concentration profiles in C_k are passed to a non-linear kinetic fitting routine that constrains these concentration profiles to obey a preselected kinetic model. An adapted Newton–Gauss–Levenberg–Marquardt algorithm, as described by Maeder and Zuberbuehler [26,27], was used for the kinetic fitting. In this case, the residuals to be minimised are defined as the difference between the input soft-modelled concentration profiles and the calculated concentration profiles based on the kinetic model and the rate constants. After the kinetic fitting, the fitted concentration profiles update the suitable ones in the MCR-ALS optimization.

There are some advantages of the HS-MCR algorithm over pure hard- and soft-modelling approaches that deserve to be commented and that will be exploited in the analysis of the photodegradation experiments. In comparison with the parent soft-modelling MCR-ALS algorithm, HS-MCR significantly reduces the rotational ambiguity associated with the kinetic profiles obtained using exclusively soft-modelling constraints and the rate constants are also provided as additional information to the resolution [19].

On the other hand, the way of implementing the kinetic fitting allows for overcoming some limitations linked to pure hard-modelling approaches. Thus, the kinetic model can be applied to some or to all the absorbing species in C_k , which is not possible in classical hard-modelling approaches, where all contributions to the signal in D should be constrained according to the preselected model [26,27]. This advantage has been used in cases where identified absorbing species other than those in the kinetic process are present in the samples studied [19]. The use of these off-process profiles can also help to model moderate differences in pure signal contributions among experiments due to instrumental variations or to different experimental conditions, as will be seen in this work.

The other main advantage linked to the analysis of a series of experiments stems from the flexibility in the application of constraints in the MCR-ALS algorithm, i.e., each submatrix of concentration profiles can be constrained independently. This is another essential difference with respect to pure hard-modelling approaches, where all experiments should follow the same global model or, if different models are used, expressions describing the connection among them are necessary. Opposite to pure hard-modelling approaches, HS-MCR can work with experiments behaving according to different unconnected kinetic models [28] and model-based and model-free experiments can be analysed together [29]. In this work, different kinetic models will be used to account for the solvent effect on the development of the degradation process.

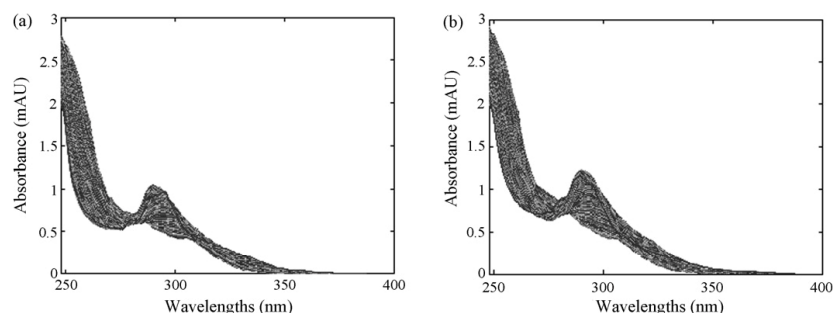


Fig. 2 – UV-vis raw spectra of photodegradation experiments at 90:10 and 60:40 (v/v) THF–water ratios.

In the previous implementation of HS-MCR [19], the different submatrices in **C** had to be fitted independently. This is an advantage when different models come into play, but it is less efficient when a series of experiments behave according to the same model. To overcome this limitation, the algorithm has been improved implementing the possibility to fit series of experiments to the same global model. This will result in more reliable modelling and estimation of the related rate constants. Again, these global models may affect all the experiments in the data set or a group of them and several global models can be used altogether. In this work, the replicates obtained with the same solvent composition will all be fit to a

single global model and there will be as many global models as solvent compositions used.

4. Results and discussion

This section will include the results obtained by UV monitoring of photodegradation experiments, showing the information gathered from individual and simultaneous analysis of experiments and from soft-modelling and hybrid hard- and soft-modelling methodologies. A final interpretation of the chemical results, as compared with complementary stud-

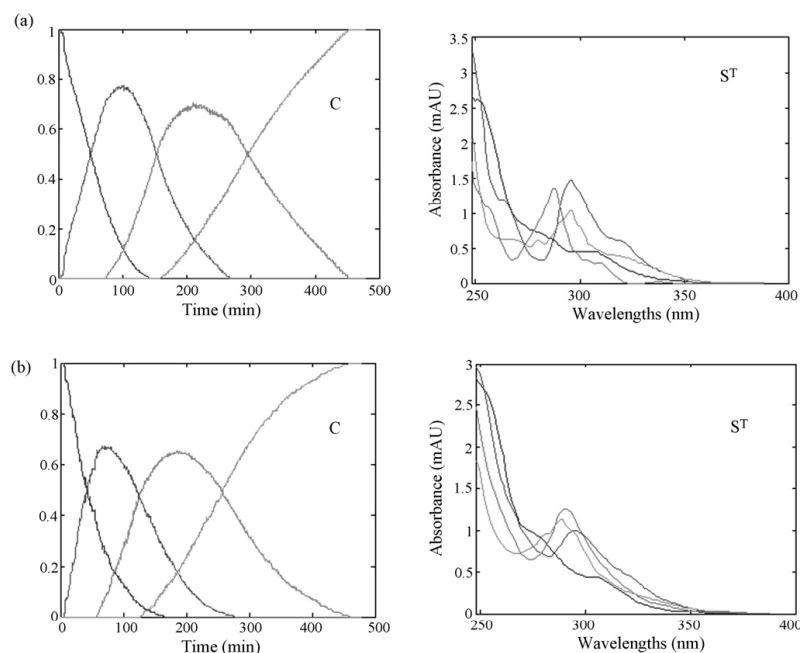


Fig. 3 – MCR-ALS resolved kinetic profiles and related pure spectra of photodegradation experiments at 90:10 (v/v) (a) and 60:40 (v/v) (b) THF–water ratios.

ies of GC–MS and works done by previous authors, will be offered.

4.1. Individual analysis of UV photodegradation experiments

4.1.1. Soft-modelling

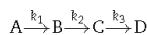
As a way of example, Fig. 2a and b shows the raw spectra obtained from the spectroscopic monitoring of the photodegradation experiments of decaBDE at 90:10 (v/v) and at 60:40 (v/v) THF–water ratios, respectively. Spectral changes in the figures confirm the clear decaBDE degradation under UV-light in different solvent compositions. These examples have been chosen because they were performed at the most different solvent compositions. As can be seen, the overall shape of spectra did not show significant differences between these two experiments.

An exploratory analysis of the process evolution by means of soft-modelling MCR-ALS has been carried out. Fig. 3a and b shows the MCR-ALS resolved concentration profiles (C_k) and pure spectra (S^T) obtained for the data in Fig. 2a and b, respectively.

Resolution of four species was achieved in both cases. These experiments have been done with freshly prepared stock solution and, hence, it can be assumed that only compound decaBDE (with original nonaBDE interferences of commercial product, 98% purity) was present at the beginning of the process. Therefore, the first species was decaBDE (confirmed by GC–MS) and the rest of species photodegradation compounds. Good data fits were observed (lack of fit $\leq 1\%$) and

the inclusion of a different number of species gave worse data fits or unreliable spectra or concentration profiles.

From the shape of the concentration profiles, the suggested kinetic model is based on three consecutive first-order reactions.



where k_1 , k_2 and k_3 are the rate constants. Assuming that the energy from the light dislodges bromine from the biphenyl ether backbone, species B, C and D could be individual congeners with fewer bromines than decaBDE or mixtures of them that have an identical kinetic behaviour. However, cyclization can also be present during the photodegradation process producing brominated dibenzofurans (PBDFs). The pronounced maxima of the spectra of species B, C and D, typical of the brominated dibenzofurans (PBDFs) [17] suggest the formation of these compounds among the breakdown products, which is in agreement with the results reported by other authors [4,6,8,17].

4.1.2. Hybrid hard- and soft-modelling

After the exploratory analysis of the data by soft-modelling, the application of the hybrid HS-MCR algorithm was carried out.

Now, initial estimates of spectra were those obtained from the previous pure soft-modelling analysis and the concentration profiles were fit to the kinetic model earlier proposed. Spectra were constrained to be non-negative. HS-MCR kinetic profiles (C_k) and pure spectra (S^T) resemble in shape to soft-modelling results (see Fig. 4)

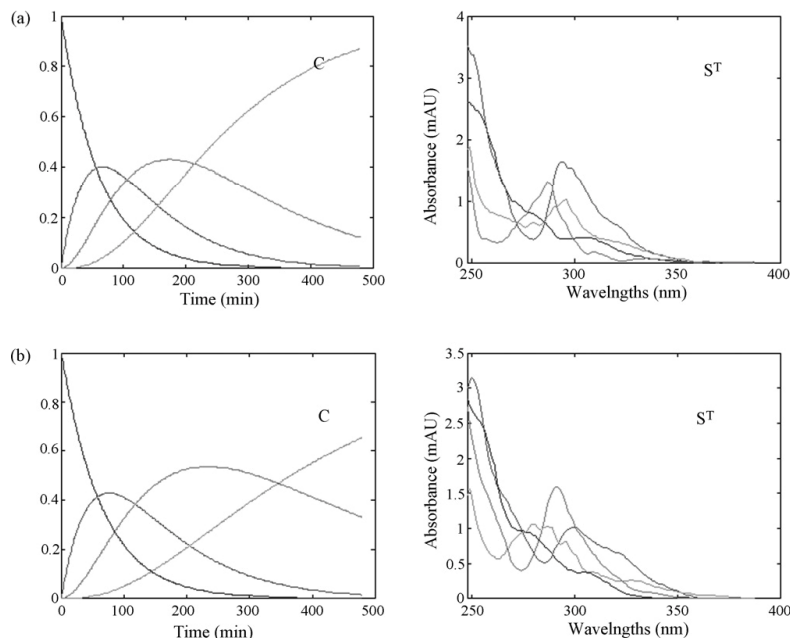


Fig. 4 – HS-MCR resolved kinetic profiles and related pure spectra of photodegradation experiments at 90:10 (v/v) (a) and 60:40 (v/v) (b) THF–water ratios.

Resolution of four species with a large spectral overlap in both experiments was also achieved. Good data fits (lack of fit $\leq 1\%$), similar to the soft-modelling analyses, were observed, indicating that the hypothesis of the selected kinetic model was correct.

The photodegradation rate constants obtained at the two different THF–water ratios were $k_1 = 3.32 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 3.17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_3 = 2.66 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (90:10, v/v) and $k_1 = 2.40 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 2.15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_3 = 1.64 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (60:40, v/v). A preliminary interpretation of the solvent polarity effect on the photodegradation rate can be extracted from these results. We can observe slower photodegradation of decaBDE at 60:40 (v/v) THF–water ratios than at 90:10 (v/v) THF–water ratios. Therefore, it seems that an increase of water in solvent composition produces a decrease of reaction rate, which is in agreement with the results found in the literature indicating a decrease of the reaction rate as polarity increases [4–18].

A relevant aspect to note is that resolved spectra of all the reacting components involved in the process have rather similar shapes (see Figs. 3 and 4), even though they are obtained at the two most different solvent compositions. This spectral similarity suggests the possibility of performing a simultaneous treatment of the experiments performed at all solvent compositions.

4.2. Simultaneous analysis of UV photodegradation experiments

To extend MCR-ALS to the simultaneous analysis of the photodegradation experiments at different THF–water ratios (90:10, 80:20, 70:30 and 60:40, v/v), it is required that the pure spectra of all reacting components involved in the process do not change among experiments. This requirement is linked to the bilinear model shown in Fig. 1b, where a single S^T matrix contains the pure spectra of the species present in all experiments. As could be seen in the individual analysis of the data matrices related to the experiments at the most different THF–water ratios, rather similar resolved spectra profiles were observed and simultaneous analysis can be attempted.

4.2.1. Soft-modelling

Simultaneous analysis by soft-modelling MCR-ALS of the three replicate photodegradation experiments corresponding to different THF–water ratios (90:10, 80:20, 70:30 and 60:40, v/v) was performed. Three replicates were made in order to ensure the repeatability of each photodegradation experiment. Fig. 5 shows the resolved augmented concentration matrix (C) and the pure spectra (S^T) of the simultaneous analysis. A good description of the data set was obtained (lack of fit $\leq 3.7653\%$ and $r^2 = 99.86\%$). The small increase in lack of fit as compared with individual analysis is due to between-experiment slight differences and to the overfitting tendency usually observed in single experiments analysis by ALS procedures [21].

Now, in contrast to the individual analysis, resolution of five species is proposed. As in individual analysis, the four species photodegradation pattern is observed. These four species suggest again the underlying kinetic model ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$). However, a new species (E) evolving differently among the experiments and not involved in the proposed kinetic model was needed to achieve a complete description of the measurement. This new detectable contribution could be originated to fit the slight solvent effect spectral differences among experiments and could also explain the slightly different variation in the rate constants of the individual congeners described by one modelled MCR-ALS contribution when changing solvent composition. In order to perform the simultaneous analysis of the different photodegradation experiments and to cope with these kinetic and spectral differences observed among the experiments, a new spectral contribution was needed.

4.2.2. Hybrid hard- and soft-modelling: study of the repeatability of replicates

In order to perform the simultaneous analysis of the different photodegradation experiments by HS-MCR, resolved spectral profiles from the multiexperiment MCR-ALS analysis were used as initial estimates.

As mentioned before, an advantage of applying HS-MCR is the possibility to constrain in a different way the concentration profiles in C_k , i.e., the hard-modelling constraint can be applied to some or to all concentration profiles in C_k . Tak-

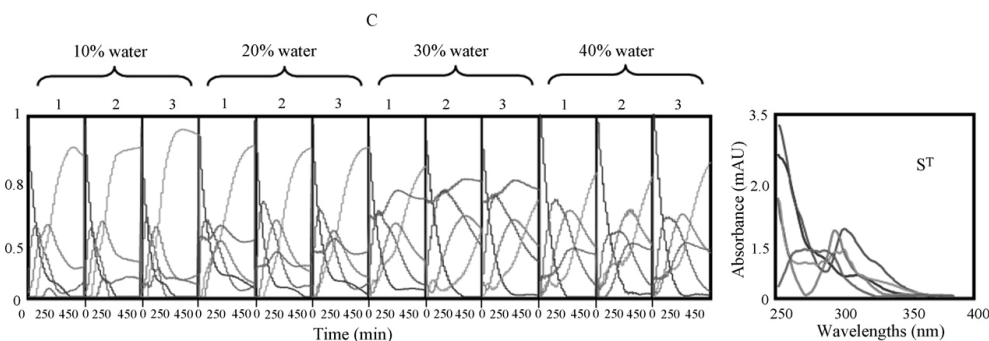


Fig. 5 – Simultaneous MCR-ALS resolution of four replicate series of photodegradation experiments at 90:10, 80:20, 70:30 and 60:40 (v/v) THF–water ratios.

Table 1 – Fit results and rate constants of simultaneous analysis of the photodegradation experiments at the different THF–water ratios by means of HS-MCR

Data fit	Composition	$k_1 (\times 10^{-4})^a$	$k_2 (\times 10^{-4})^a$	$k_3 (\times 10^{-4})^a$
% lack of fit = 4.4; $\%r^2 = 99.81$	90:10 THF–water	2.32 (1)	2.60 (2)	1.380 (6)
		2.46 (2)	3.13 (4)	1.207 (9)
		3.32 (2)	3.26 (3)	2.03 (1)
	80:20 THF–water	2.03 (1)	1.91 (1)	1.83 (1)
		2.80 (1)	1.632 (6)	1.259 (5)
		2.41 (1)	1.741 (7)	1.489 (6)
	70:30 THF–water	2.392 (9)	1.328 (4)	1.004 (3)
		1.906 (7)	0.62 (2)	0.40 (3)
		2.450 (9)	0.84 (2)	0.67 (3)
	60:40 THF–water	2.06 (1)	1.080 (6)	0.71 (5)
		1.603 (8)	1.312 (7)	0.73 (4)
		1.98 (1)	1.308 (6)	0.85 (4)

^a Values in parenthesis are errors associated to the kinetic fitting optimization.

ing into consideration the assumption that species E is not involved in the kinetic process; this species was only soft-modelled. On the contrary, species A, B, C and D were fitted to the proposed kinetic model. For the sake of investigating the repeatability of replicate experiments, each experiment was fitted individually to the kinetic model ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$).

The resolved concentration profiles and the spectra are consistent with the reference kinetic model and with the pure spectra obtained in the individual analysis (not shown). As in soft-modelling MCR-ALS, the same photodegradation pattern of four species could be observed. A rather similar fit to soft-modelling MCR-ALS was obtained (lack of fit < 5% and $r^2 = 99.81\%$), confirming again the previously proposed kinetic model ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$). In order to achieve a complete description of the measurement, species E, which was not involved in the kinetic process, is also needed. Fit results and rate constants obtained for the simultaneous analysis of the photodegradation experiments at different THF–water ratios by means of HS-MCR are listed in Table 1.

It is worth noting that HS-MCR allowed the resolution of series of experiments taken under different conditions (90:10, 80:20, 70:30 and 60:40 (v/v) THF–water ratios) and, hence, showing different kinetic profiles and rate constants. The rate constants (k_1 , k_2 and k_3) follow the same pattern as in the indi-

vidual analysis. A slight decrease in rate constants at higher water proportions in the solvent was observed. The individual fitting of each experiment to a kinetic model allows checking for the repeatability of replicates. As can be seen in Table 1, good repeatability was achieved within each set of replicates, except for the second replicate of photodegradation experiment at 70:30 (v/v) THF–water ratios, slower than any other experiment, which was not finally included in the definitive fitting of replicates to a global model. Presumably there was some unknown systematic error in the realization of this replicate.

4.2.3. Hybrid hard- and soft-modelling: global fit of experiments performed at different solvent compositions

After checking the repeatability of replicate experiments and eliminating the outlying experiment, more reliable results could be obtained when fitting each set of replicates (done at a particular solvent composition) to a single global model. This means that four global models incorporating species A, B, C and D, each related to a different solvent composition, were fitted in the simultaneous analysis. As a consequence, the concentration profiles and related rate constants were estimated in a more accurate and robust way (Fig. 6). The E species was left out of the

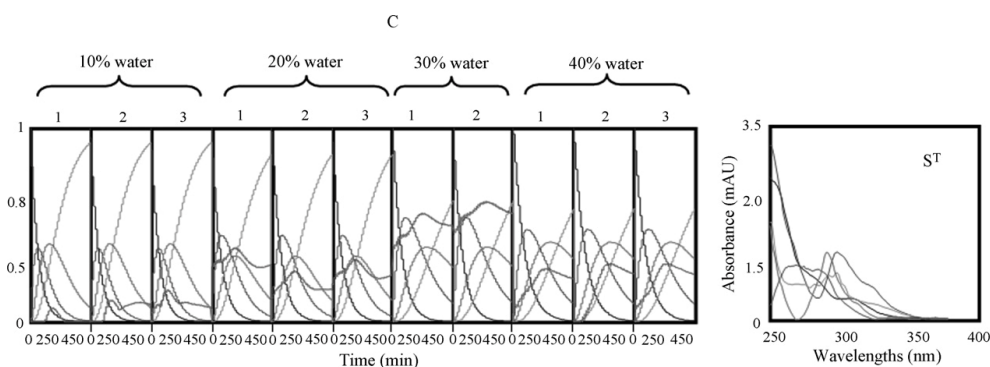


Fig. 6 – Simultaneous HS-MCR resolution with global models of four replicate series of photodegradation experiments at 90:10, 80:20, 70:30 and 60:40 (v/v) THF–water ratios.

Table 2 – Fit results and rate constants of simultaneous analysis of the photodegradation experiments at the different THF–water ratios by means of global models HS-MCR

Data fit	Composition	$k_1 (\times 10^{-4})^a$	$k_2 (\times 10^{-4})^a$	$k_3 (\times 10^{-4})^a$
% lack of fit = 5.2; $r^2 = 99.73$	90:10 THF–water	2.76 (1)	2.60 (2)	1.38 (6)
	80:20 THF–water	2.448 (8)	1.613 (5)	1.362 (4)
	70:30 THF–water	2.41 (1)	0.99 (4)	0.77 (4)
	60:40 THF–water	1.933 (6)	1.092 (3)	0.68 (2)

^a Values in parenthesis are errors associated to the kinetic fitting optimization.

kinetic model and was modelled using only soft-modelling constraints.

Again, the pattern of four species, which follows the kinetic model based on three consecutive first-order reactions ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$) was confirmed and the spectral contribution of species E was also needed to perform the complete description of the data set. Good data fit was also observed (lack of fit < 5.2% and $r^2 = 99.73\%$), on the same level as obtained by the more flexible HS-MCR analysis with individual kinetic fit of experiments. However, more reliable rate constants were obtained and the solvent effect on the photodegradation process could be more easily interpreted. Table 2 lists the data fit parameters and the rate constants obtained for the simultaneous analysis of the photodegradation experiments at different THF–water ratios by means of HS-MCR with global model fits.

In agreement with the conclusions of other authors, the photodegradation rate of PBDEs increases with the degree of bromination, as can be seen in Table 2, where $k_1 > k_2 > k_3$ for all solvent compositions. These results would confirm that species B, C and D could be individual or congener mixtures with fewer bromines than decaBDE. However, from the shape of the pure spectra, we suggest the possible simultaneous formation of brominated dibenzofurans (PBDFs) among the breakdown products.

The order of magnitude of the rate constants found is also in agreement with the photodegradation rates found in the literature. Thus, Barcellos et al. [14] studied the photodegradation of decaBDE in toluene using a filtered Xe lamp as solar simulator. The photodegradation rate constant reported was $k_{\text{obs}} = 3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and decrease of debromination rate constants with the debromination steps was observed. Eriksson et al. [8] have reported photodegradation rates from tetra to decaBDEs in methanol–water ranging from $k_{\text{obs}} = 6.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ for the lowest tetraBDE to $k_{\text{obs}} = 3.98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for decaBDE. Bezares-Cruz et al. [10] presented a quantitative photodegradation study of decaBDE in hexane under natural sunlight. The observed first-order reaction rate constants at the different exposure times were $k_{\text{obs}} = 1.86 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (July) and $k_{\text{obs}} = 1.11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (October). The higher photodegradation rates in this work are due to the lower polarity of hexane as compared with hydroorganic solvent mixtures. Thus, the solvent polarity effect on the degradation process can be confirmed, concluding a decrease of the reaction rate as polarity increases.

An important difference with these previous studies is the fact that all of them provide a single value of photodegradation rate to describe the decay of each particular PBDE, but the study of the successive degradation steps is omitted. As far as we know, this is the first attempt of describing in a comprehen-

sive way the photochemical degradation process of the PBDE family of compounds, with all successive steps and related rate constants. Obtaining these results has been feasible with the powerful chemometric approach described in the present study.

Looking at Table 2, the solvent effect on the development of the photodegradation process can be studied. The first conclusion is that, in all reaction steps, represented by the rate constants k_1 , k_2 and k_3 , there is a decrease in the reaction rate as the solvent polarity, i.e., the percent of water in the mixtures, increases. Plotting the logarithms of these rate constants vs. the percentage of tetrahydrofuran, acceptable linear relationships can be established (equations: $-\log k_1 = -0.005(1)\% \text{THF} + 3.98(9)$, $-\log k_2 = -0.013(4)\% \text{THF} + 4.8(3)$ and $-\log k_3 = -0.012(3)\% \text{THF} + 4.8(2)$) with correlations coefficients of 0.94, 0.91 and 0.93 for k_1 , k_2 and k_3 , respectively. The offsets of these regression lines ($\% \text{THF} = 0$) correspond to the values of the rate constants in water ($k_1 = 1.0 \times 10^{-4}$ (9), $k_2 = 0.2 \times 10^{-4}$ (1) and $k_3 = 0.1 \times 10^{-4}$ (1)). Nevertheless, these values should be considered as a gross estimation of the real rate constants in the environmental aqueous medium, since many other compounds are dissolved in the natural aqueous systems that could affect the kinetic development of the reaction.

4.3. Analysis of decaBDE photodegradation products by GC–MS

Extracts from UV incubations at different process times were analysed by GC–NCI–MS to confirm the results of UV experiments and to help in the identification of group photodegradation products. The total ion current chromatograms (TIC) of the different GC–NCI–MS runs were used to analyse the photodegradation of decaBDE since the elution pattern contains the relevant information to distinguish among groups of photodegradation products. TIC chromatograms collected at different reaction times were organized in a data matrix D, as shown in Fig. 7. This matrix D was resolved by soft-modelling MCR–ALS into a matrix of kinetic profiles (C) and a matrix of related TIC chromatograms (S^T), as shown in Fig. 7.

Resolution of four species following the kinetic model earlier proposed was also achieved and this confirmed the mechanism proposed from UV process monitoring. The resolved TICs contain the chromatographic peaks of all compounds presenting the same kinetic behaviour throughout the process. As can be seen in Fig. 7, many chromatographic peaks and, therefore, many congeners and other brominated compounds as PBDFs, belong to the same ‘pure’ TIC. This means

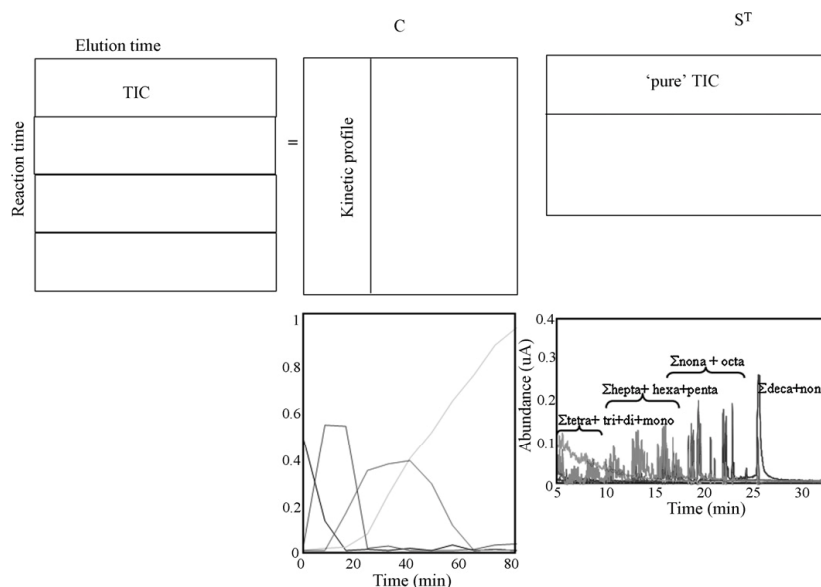


Fig. 7 – Simultaneous MCR-ALS resolution of TIC chromatograms collected at different reaction times corresponding to the photodegradation experiment of decaBDE.

that the pure spectra obtained from UV–vis resolution should be attributed to mixtures of congeners rather than to single specific chemical compounds.

In order to identify the compounds in the ‘pure’ TICs of S^T , retention time ranges in the resolved TICs were compared with retention times of the GC–NCl–MS standard runs. In this way, homolog groups of PBDEs were identified within structural isomer groups (e.g., octaBDEs, heptaBDEs, ...) owing to the similar GC retention times as compared with the available standards. Thus, the first kinetic profile corresponds to the peak of decaBDE and some impurities of nonaBDE, the second corresponds to a mixture of nona- and octaBDE, the third one is a mixture of hepta-, hexa- and pentaBDEs and the fourth is a mixture of congeners with lower bromination degree. Both UV and GC experiments confirmed that photolytic debromination of decaBDE is a possible pathway for the formation of lowly brominated BDEs in the environment, which is in agreement with other studies found in literature [4–18] and warns about the still permitted use of this PBDE compound. However, in the probable case of debromination and cyclization acting simultaneously in the photodegradation process (as suggested by their UV spectra), the second, third and fourth kinetic profiles would also be describing the mixed formation of different PBDFs. A specific distinction and identification of all species involved in the degradation process was not possible because of the limits in the selectivity of the MS detection system and the lack of available standards for the large number of possible products formed (chromatographic identification). In future works, the incorporation of more selective and specific MS detection systems and the use of LC coupled to MS is planned

to allow for a more specific identification of the individual photodegradation products.

5. Conclusions

This work has presented a comprehensive description of the kinetics linked to the photochemical degradation process of decaBDE, with all successive steps and related rate constants. This study has interpreted the effects of the key factors involved in the evolution of the PBDEs photodegradation, namely the bromination degree and the solvent polarity.

Using the advantages of hard- and soft-modelling, simultaneous analysis of experiments at different solvent compositions, i.e., with different rate constants and slightly different spectral shapes, could be carried out by means of the hybrid hard- and soft-modelling approach. The new incorporation of global kinetic model fits allowed obtaining more accurate estimates of rate constants for groups of experiments performed in similar experimental conditions. Study of the solvent polarity effect has shown that an increase of water in solvent composition produces a decrease of reaction rate. From the results obtained in several hydroorganic mixtures, a gross estimation of the degradation behaviour of these compounds in water has been inferred.

The interpretation of all successive steps of the decaBDE degradation process has shown how the parent compound decaBDE can end up its environmental fate transformed in more toxic compounds, such as small PBDEs and PBDFs family congeners, and warns about the environmental impact and health hazard of the prolonged use of this compound

for industrial and everyday purposes. The use of hybrid hard- and soft-modelling multivariate curve resolution-alternating least squares (HS-MCR) has contributed to increase the knowledge of the photodegradation of PBDEs and to provide efficient methodology for the comprehensive study of this kind of process and, in general, of any environmentally relevant photochemical reaction.

Acknowledgements

This research has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science (projects CTM2005-07402-C02-01/TECNO and CTQ2006_15052_C02_1/BQU). Sílvia Mas acknowledges a Ph.D. grant UAC 2005-0071 from the Ministry of Education and Science (Associated Unit between University of Barcelona and CSIC).

REFERENCES

- [1] Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers, World Health Organization, Geneva, 1994.
- [2] C.A. de Wit, *Chemosphere* 46 (1991) 583.
- [3] P. Cox, P. Efthymiou, Directive 2003/11/EC of the European parliament and of the council of February 6 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/669/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). *Off J Eur Union OJ L* 42 (2003) 45.
- [4] G. Söderström, U. Sellström, C.A. de Wit, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 127.
- [5] J.M. Norris, J.W. Ehrmantraut, C.L. Gibbons, R.J. Kociba, B.A. Schwetz, J.Q. Rose, C.G. Humiston, G.L. Jewett, B.W. Crummett, P.J. Gehring, J.B. Tirsell, J.S. Brosier, *Appl. Polym. Symp.* 22 (1973) 195.
- [6] I. Watanabe, R. Tatsukawa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (1987) 953.
- [7] S. Otha, H. Nishimura, T. Nakao, O. Aozasa, H. Miyata, *Organohalogen Compd.* 52 (2001) 321.
- [8] J. Eriksson, N. Green, G. Marsh, A. Bergman, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3119.
- [9] A. Palm, I.T. Cousins, D. Mackay, *Environ. Pollut.* 117 (2002) 195.
- [10] J. Bezares-Cruz, C.T. Jafvert, I. Hua, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4149.
- [11] L. Sánchez-Prado, M. Lores, M. Llompарт, C. García-Jares, J.M. Bayona, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 157.
- [12] I. Hua, N. Kang, C.T. Jafvert, J.R. Fábrega-Duque, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 798.
- [13] J. Niu, Z. Shen, Z. Yang, X. Long, G. Yu, *Chemosphere* 64 (2006) 658.
- [14] M. Barcellos da Rosa, H.-U. Krüger, S. Thomas, C. Zetzsch, *Fresenius Environ. Bull.* 12 (2003) 940.
- [15] M.Y. Ahn, T.R. Filley, C.T. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz, *Environ. Toxicol. Chem.* 40 (2006) 215.
- [16] M.Y. Ahn, T.R. Filley, C.T. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz, *Chemosphere* 64 (2006) 1801.
- [17] A. Palm, R. Kopetzky, W. Sossinka, W. Ruck, C. Zetzsch, *Organohalogen Compd.* 66 (2004) 4105.
- [18] J.D. Raff, R.A. Hites, *Environ. Toxicol. Chem.* 41 (2007) 6725.
- [19] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 123.
- [20] J.M. Amigo, A. de Juan, J. Coello, S.A. MasPOCH, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 245.
- [21] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
- [22] R. Tauler, A. Smilde, R. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [23] G.H. Golub, Ch.F. Van Loan, *Matrix Computations*, 2nd Ed., The John Hopkins University Press, London, 1989.
- [24] W. Winding, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 16 (1992) 1.
- [25] H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbuehler, *Anal. Chim. Acta* 193 (1987) 287.
- [26] M. Maeder, A. Zuberbuehler, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2220.
- [27] M. Maeder, Y.M. Neuhold, *Practical data analysis in chemistry*, Elsevier Ltd., Netherlands, 2007.
- [28] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 337.
- [29] G. Muñoz, A. de Juan, *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 198.

Comprehensive liquid chromatography–ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices

Sílvia Mas,¹ Olga Jáuregui,² Fernando Rubio,³ Anna de Juan,⁴ Romà Tauler¹ and Sílvia Lacorte^{1*}

¹ Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

² Scientific and Technical Services, University of Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

³ ABRAXIS LLC, Northampton Business Center, 54 Steamwhistle Drive, Warminster, Pennsylvania 18974, USA

⁴ Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

Received 31 January 2007; Accepted 3 April 2007

We propose an instrumental method based on liquid chromatography coupled to negative ion-spray ionization (ISP(–)) tandem mass spectrometry (MS/MS), for the simultaneous analysis of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in four different environmental matrices (soil, fish, sludge and particulate matter). The reversed-phase chromatographic separation was performed on a 50 mm Xbridge C18 column, and the compounds were well resolved with a gradient consisting of a ternary mixture of 5 mM ammonium acetate, methanol and acetonitrile. Detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using the $[M - H]^-$ ion as base peak. The fragmentation pathways of the OH-PBDEs varied according to the hydroxyl substitution in the benzene rings and produced characteristic MRM transitions needed for resolving isomeric compounds. The method is acceptable for quantification in the high picogram per gram dry weight (dw) level for all matrices analyzed. Repeatability and reproducibility tested at 75 pg μL^{-1} were below 10% using internal standard quantification. The ISP(–) enhancement due to matrix effects was in the 76–132% range and the highest values corresponded to sludge samples. The use of the proposed method based on LC-ISP(–)-MS/MS opens a new way to directly determine OH-PBDEs without the need of derivatization. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: OH-PBDEs; liquid chromatography-ion-spray tandem mass spectrometry; multiple reaction monitoring; quality parameters; environmental samples

INTRODUCTION

The study of polybromodiphenyl ethers (PBDEs) is currently of interest owing to the widespread application of these compounds and their increasing levels found in many diverse environmental samples such as sediments,¹ sludge,² indoor air,³ fish,⁴ marine mammals,⁵ breast milk,⁶ etc. PBDEs are produced in large amounts and the main sources of pollution are electronic, textile and plastic industries, which use these compounds as flame-retardants.⁷ Besides, these compounds are suspected to travel through the atmosphere in either the gaseous or particulate phase⁸ and this suggests that they can be found in remote sites.⁹

PBDEs are well-known contaminants since long, but their metabolic pathways are still under investigation. Hydroxylated PBDEs (OH-PBDEs) have been detected as metabolites of PBDEs in rats, mice and fish.^{10–12} In rats

exposed to BDE-47, 3-OH-BDE-47, 4'-OH-BDE-49, 6-OH-BDE-47 and other OH-di and OH-tribDEs were identified.¹³ In humans, 3-OH-BDE-47, 4'-OH-BDE-49 and 6-OH-BDE-47 were also detected.¹⁴ It is reported also that some of the OH-tetraBDEs may originate from metabolism of BDE-99 and BDE-100.^{12,15} In other studies, OH-PBDEs have been isolated, structurally identified and determined as natural products in marine sponges^{16,17} and ascidians (tunicates),^{18,19} and have been detected in red algae.²⁰

Powerful analytical methods have been proposed for the analysis of OH-PBDE metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). OH-tetraBDEs congeners were analyzed in fish plasma from the Detroit river using GC with electron ionization (EI) and high-resolution mass spectrometry (HRMS),²¹ with diazomethane as the derivatizing agent. OH-PBDEs have also been identified in the Baltic Sea salmon (*Salmo salar*)²² and in human blood²³ by GC-MS using EI and negative chemical ionization (NCI) as ionization techniques and diazomethane as the derivatizing agent. Using GC-NCI-MS, some OH-PBDEs have also been

*Correspondence to: Sílvia Lacorte, Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain. E-mail: slbqam@cid.csic.es

detected in birds²⁴ and in marine mammals.²⁵ However, the analysis of these compounds by GC always required a derivatization step prior to injection.

The main disadvantages of analyzing OH-PBDEs by GC-MS with a derivatizing agent are: (1) long analysis time due to multiple sample preparation step; (2) handling of harmful/carcinogenic reactants (i.e. diazomethane, dimethylsulfate, diethylsulfate) and the risk of explosion when preparing diazomethane, which is the most used methylating reagent in this context; and (3) possible quantification errors since the derivatization reaction may give less than 100% yield. Even a powerful and selective derivatization reagent such as diazomethane may not give quantitative results for all OH-PBDE congeners.

Moreover, when using GC with NCI to determine derivatized OH-PBDEs, the lack of specific masses other than the bromine ions (m/z 79, 81) results in more inconclusive identification. Therefore, derivatization of OH-PBDEs to methoxylated-PBDEs (MeO-PBDEs) has some disadvantages compared to the direct determination of OH-PBDEs.

To date, Hua *et al.* developed a liquid chromatography coupled to negative ion-spray ionization tandem mass spectrometry (LC-ISP(-)-MS/MS) based method for the analysis of triclosan, where 2'-OH-2,4,4'-tribromodiphenyl ether (2'-OH-BDE-28) was used as internal standard for its quantification. Using multiple reaction monitoring (MRM), limits of quantification (LOQ) of 2'-OH-BDE-28 in the low ppb range were obtained and two non-target OH-tribDEs were detected in waste and surface waters.²⁶ However, as far as we know, LC-MS methodologies have not been investigated for the simultaneous determination of different OH-PBDEs. Given the state of the art, the aim of the present study is to propose a new LC-MS/MS method for the precise and selective analysis of eight OH-PBDEs from di- to tetrabrominated compounds. The applicability and robustness of the proposed method have been verified using spiked environmental samples (soil, fish, sludge and particulate matter).

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Individual native OH-PBDEs standards were from Accu-standard (New Haven, USA) and were purchased at a concentration of 10 or 50 ng μL^{-1} in acetonitrile. The compounds studied were: 3'-OH-2,4-dibromodiphenyl ether (3'-OH-BDE-7), 3'-OH-2,4,4'-tribromodiphenyl ether (3'-OH-BDE-28), 2'-OH-2,4,4'-tribromodiphenyl ether (2'-OH-BDE-28), 4'-OH-2,2',4-tribromodiphenyl ether (4'-OH-BDE-17), 4'-OH-2,2',4,5'-tetrabromodiphenyl ether (4'-OH-BDE-49), 6-OH-2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (6-OH-BDE-47), 3-OH-2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (3-OH-BDE-47) and 5-OH-2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (5-OH-BDE-47). These standards were evaporated under a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a concentration of 10 ng μL^{-1} . Individual stock solutions were prepared at 2 ng μL^{-1} using 50:20:305 mM ammonium acetate buffer/acetonitrile/methanol (v/v/v) to perform flow injection analysis (FIA). A working solution containing all eight

OH-PBDEs was prepared in methanol at a concentration of 1 ng μL^{-1} . Deuterated standard bisphenol-A- d_4 (d_4 -BPA, Dr. Ehrestorfer, Germany) was used as the internal standard. ^{13}C PBDE77 and ^{13}C PBDE 126 (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) were also tested as internal standards but they were not used further because they did not produce any response with LC-MS/MS. Table 1 lists the compounds (according to the IUPAC nomenclature) and chemical structures of the analyzed compounds, together with the internal standard.

HPLC-grade methanol, acetonitrile and 2-propanol were from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO USA); analytical grade ammonium acetate and acetone from Panreac (Montcada i Reixac, Catalonia, Spain); 98% 1-methoxy-2-propanol acetate from Sigma-Aldrich; and acetic acid from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure H_2O (MilliQ water), with a conductivity $<0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$, was obtained using a MilliQ water purification system (Millipore, Mosheim, France).

Sample extraction

The samples tested were raw sludge from an urban waste water treatment plant (total organic content of 46%), an agricultural soil (total organic content of 2.5%), fish muscle from carp (*Cyprinus carpio*) and particulate matter from the influent of a waste water treatment plant. Sludge, soil and fish were freeze-dried at -50°C and 10^{-2} mbar and samples were homogenized and sieved to obtain the $<500 \mu\text{m}$ fraction. One gram of the $<500 \mu\text{m}$ fraction was extracted with 30 ml of hexane:dichloromethane (1.1, v/v) for 10 min in an ultrasonic bath. The sample was centrifuged at 2000 rpm and the solvent was recovered. This extraction procedure was repeated three times and the extracts were combined and partially evaporated under a gentle stream of nitrogen. Sulphuric acid was used to purify the extracts. Two milliliters of sulfuric acid was added to approximately 20 ml of the extract. After vigorous manual shaking for 2 min, the mixture was allowed to settle down for 5 min and the sulfuric acid layer was discarded. This clean-up step was repeated until a colorless sulfuric acid layer was obtained. Afterwards, the extract was cleaned with purified water to remove traces of sulfuric acid and it was passed through a micropipette containing hydromatrix (baked at 400°C for 12 h) to remove residual water. The extract was reconstituted with 50 μL of methanol and at this stage OH-PBDEs were spiked, producing a concentration of 25 and 375 pg μL^{-1} . For particulate matter, 200 ml of wastewater was filtered through preweighed and precleaned (baked at 400°C for 12 h) 0.7 μm glass fiber filters. These filters were freeze-dried and extracted using the same conditions as described above.

Liquid chromatography-mass spectrometry

Analyses were carried out using a liquid chromatograph coupled to a tandem mass spectrometer. An Agilent 1100 series HPLC system (Waldbronn, Germany) equipped with a quaternary pump was connected to an API 3000 triple-quadrupole MS/MS system (PE Sciex, Concord, ON, Canada). The data were acquired and processed using the Analyst 1.4.2 software package.

Three chromatographic columns were tested: a Discovery HS C_{18} column (50 mm, 2.1 mm i.d., 3.5 μm particle size)

Table 1. Abbreviations according to IUPAC nomenclature and structures of the analyzed compounds and internal standard

Compound	Structure	Compound	Structure
3'-OH-BDE-7		3-OH-BDE-47	
3'-OH-BDE-28		5-OH-BDE-47	
4'-OH-BDE-17		4'-OH-BDE-49	
2'-OH-BDE-28		6-OH-BDE-47	
Bisphenol-A-d ₄ (d ₄ -BPA): Internal standard			

from Supelco (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO USA), an XTerra phenyl (50 mm, 2.1 mm i.d., 5 μ m particle size) and an XBridge C₁₈ column (50 mm, 2.1 mm i.d., 3.5 μ m particle size) from Waters (Milford, MA, USA), all programmed at room temperature. Finally the XBridge C₁₈ column was chosen to carry out the experiments. The mobile phase composition was also optimized first using binary mixtures with 5 mM ammonium acetate as a buffer with either methanol or acetonitrile. The ternary mobile phases used were combinations of 5 mM ammonium acetate, 5 mM ammonium acetate with 2% 2-propanol, 2% acetone or 2% 1-methoxy-2-propanol acetate with methanol and acetonitrile. Finally, the following ternary mobile phase was chosen: 5 mM ammonium acetate buffer (solvent A), acetonitrile (solvent B) and methanol (solvent C). The elution program started with an initial composition of 50:20:30 A/B/C (v/v/v) and increased linearly to 25:20:55 A/B/C (v/v/v) in 10 min, maintaining this condition for 10 min before returning to the initial condition. The flow rate was 250 μ l min⁻¹. The column was equilibrated for 10 min between runs. The samples were kept at 4 °C in an autosampler and the injected volume was 10 μ l.

A divert valve (Valco, Houston, TX) drained off the LC eluent when interferences were detected and was used in order to avoid contamination of the mass spectrometer.

Two atmospheric pressure ionization techniques, ion-spray (ISP) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI), were assessed under both positive and negative ionization. The best conditions were attained with the Turbo ISP source in the negative mode with the following settings: capillary voltage -4000 V, curtain gas (N₂) 12 (arbitrary

units), nebulizer gas (N₂) 10 (arbitrary units), collision gas (N₂) 4 (arbitrary units), focusing potential -200 V, entrance potential (EP) -10 V, collision cell exit potential (CXP) -15 V and drying gas (N₂) heated to 400 °C and introduced at a flow rate of 5000 cm³ min⁻¹. With these conditions, a careful optimization process was carried out to achieve the best sensitivity in MRM with the most suitable declustering potential (DP) and collision energy (CE) for each compound. The DP was varied from 0 to -200 V and the CE from -5 to -80 V. MS and MS/MS parameters were optimized in infusion experiments using individual standard solutions of the eight OH-PBDEs and the d₄-BPA as internal standard at a concentration of 2 ng μ l⁻¹ diluted in mobile phase 50:20:30 A/B/C (v/v/v). These solutions were pumped into the mass spectrometer using a syringe pump, Model 11 (Harvard Apparatus, Holliston, MA), at a constant flow rate of 10 μ l min⁻¹.

Full-scan data acquisition was performed by scanning from m/z 100 to 600 (Q1 scan range) in the profile mode, using a scan time of 2 s with a step size of 0.1 u and a pause between each scan of 2 ms. To choose the fragmentation patterns of m/z (Q1) \rightarrow m/z (Q3) ions for the MRM transitions, product ion scan (PIS) mass spectra were recorded by collision-activated dissociation (CAD) of selected precursor ions in the collision cell of the triple-quadrupole mass spectrometer and analyzed using the second analyzer of the instrument. MRM experiments were performed using a dwell time of 125 ms.

Identification criteria

The LC-ISP(-)-MS/MS compound identification criteria included: (1) from 2 to 4 product ions and when possible, two MRM transitions for each investigated OH-PBDE; (2) retention time of studied compounds within 3 s to that of a standard; (3) isotope ratio of two ions monitored per congener within 15% of the theoretical isotopic ratio; and (4) signal-to-noise ratio (S/N) for both ions of a specific congener of 3 or higher. These criteria were accomplished for all compounds except for 3-OH-BDE-7 and 2'-OH-BDE-28, for which a single MRM transition was used to avoid decrease in sensitivity. The retention time shift was lower than 1.1%.

Quality assurance and quality control

Quantitative analysis was performed by MRM using the most intense signal for each compound and both internal (using d_4 -BPA as internal standard) and external standard calibration. A series of injections of the target compounds in the concentration range of 25, 75, 125, 250, 375, 500 and 675 $\text{pg}\mu\text{l}^{-1}$ with the surrogate standard (d_4 -BPA) constant at 1000 $\text{pg}\mu\text{l}^{-1}$ were used to determine the linear concentration range. LOQ for each compound were calculated at a signal-to-noise ratio of 10. Repeatability and reproducibility were evaluated by intra- and inter-assay variation, respectively. Intra-assay variation was assessed by five consecutive injections of 75 $\text{pg}\mu\text{l}^{-1}$ standard solution, and inter-assay variation was determined by measuring the same standard solution on four different days. Solvent blanks did not contain any of the investigated analytes, indicating no carryover effect between LC-MS/MS runs.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of MS and MS/MS parameters

Two atmospheric pressure ionization techniques, ISP and APCI, were assessed under both positive and negative ionization conditions in order to achieve maximum sensitivity and to obtain enough structural information. APCI did not provide enough sensitivity in any ionization mode. Therefore, ISP (-) was found to be the most suitable ionization technique for all target compounds and achieved higher sensitivity than ISP (+).

Using a Q1 scan in infusion experiments, the $[\text{M} - \text{H}]^-$ base peak formed was at m/z 500.8 for OH-tetraBDE, m/z 421.0 for OH-triBDE, m/z 342.8 for OH-diBDE and 231.1 for d_4 -BPA, with a very limited degree of fragmentation (<5%). Following the successful detection of the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion, the selected ion monitoring (SIM) mode was employed to optimize the Q1 parameters. The most intense signal was obtained at relatively moderate values of the DP (between -35 and -70 V). In general, the lower the degree of bromination, the higher the DP needed. The ion-spray voltage caused one of the largest variations in signal intensity. Thus, a clear increase in the ion signal was observed in the potential range from -2500 to -4000 V, but no significant increase in the ion signal was observed in the potential range from -4000 to -4500 V. To avoid the possible background noise, -4000 V was chosen as the optimal ion-spray voltage.

Subsequently, MS/MS conditions were investigated and the PIS for the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion precursor was recorded. The $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions of the different congeners behaved similarly towards CAD in the collision cell of the triple-quadrupole mass spectrometer, but they could be distinguished because of the differences observed in the fragment ions, owing to the different positions of the hydroxyl group. For meta-hydroxylated PBDEs (3'-OH-BDE-7, 3-OH-BDE-28, 3-OH-BDE-47 and 5-OH-BDE-47), bromine abstraction, cleavage of the ether bond producing bromophenolate anions and formation of both ^{79}Br and ^{81}Br isotopes were observed. For para-hydroxylated PBDEs (4'-OH-BDE-17 and 4'-OH-BDE-49), cleavage of the ether bond producing bromobenzoquinone anions and the formation of both ^{79}Br and ^{81}Br isotopes were observed. Finally, for ortho-hydroxylated PBDEs (2'-OH-BDE-28 and 6-OH-BDE-47) only the formation of both ^{79}Br and ^{81}Br isotopes was observed. The negative ISP-MS/MS mass spectra of one example of each meta-, para- and ortho-substituted hydroxylated-PBDE are shown in Fig. 1.

The formation of specific fragment ions produced by the different congeners allowed the development of efficient analytical methods based on the MRM mode. The most intense MRM transition for each compound was used for quantification. The $[\text{M} - \text{H}]^-$ precursor ion, the product ions and their proposed formula, and the MRM transitions with their optimized DPs and collision energies for each compound, are listed in the Table 2. When possible, two specific transitions were recorded per compound, which permitted unequivocal identification. For 3'-OH-BDE-7, only a single transition was used because this compound did not coelute with any other congener and it was highly specific owing to the relative high masses of the MRM transition. As specified in Table 2, both DP and CE are quite different for the transitions $500.8 \rightarrow 80.8$ and $500.8 \rightarrow 78.7$, although they should occur at the similar energies. However, for 6-OH-BDE-47, the transition $500.8 \rightarrow 78.7$ at a DP and CE of -35 and -40 V gave higher sensitivity than at -60 and -70 V and were used for quantification. Therefore, values of -35 and -40 V of DP and CE voltages were selected also for the monitoring of the other compounds, which did not affect their sensitivity because they were quantified at other more selective or sensitive transitions. An unnecessary increase in the number of MRM transitions monitored could lead to a decrease in the method sensitivity.

As deduced from the MS/MS optimized parameters, compounds presenting different $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions, such as d_4 -BPA and 3'-OH-BDE-7, or presenting characteristic transitions, such as para-OH-PBDEs, could be quantified individually by monitoring the respective MRM transitions, whereas isomers with a common $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion and common transitions could be quantified only after being separated chromatographically.

Optimization of HPLC conditions

In an attempt to resolve the coelution of isomeric species, three HPLC chromatographic columns were tested: a Discovery HS C18 column (50 mm, 2.1 mm i.d., 3.5 μm particle size) (Supelco), a XTerra phenyl (50 mm, 2.1 mm i.d., 5 μm particle size) (Waters) and a XBridge C18 column (50 mm,

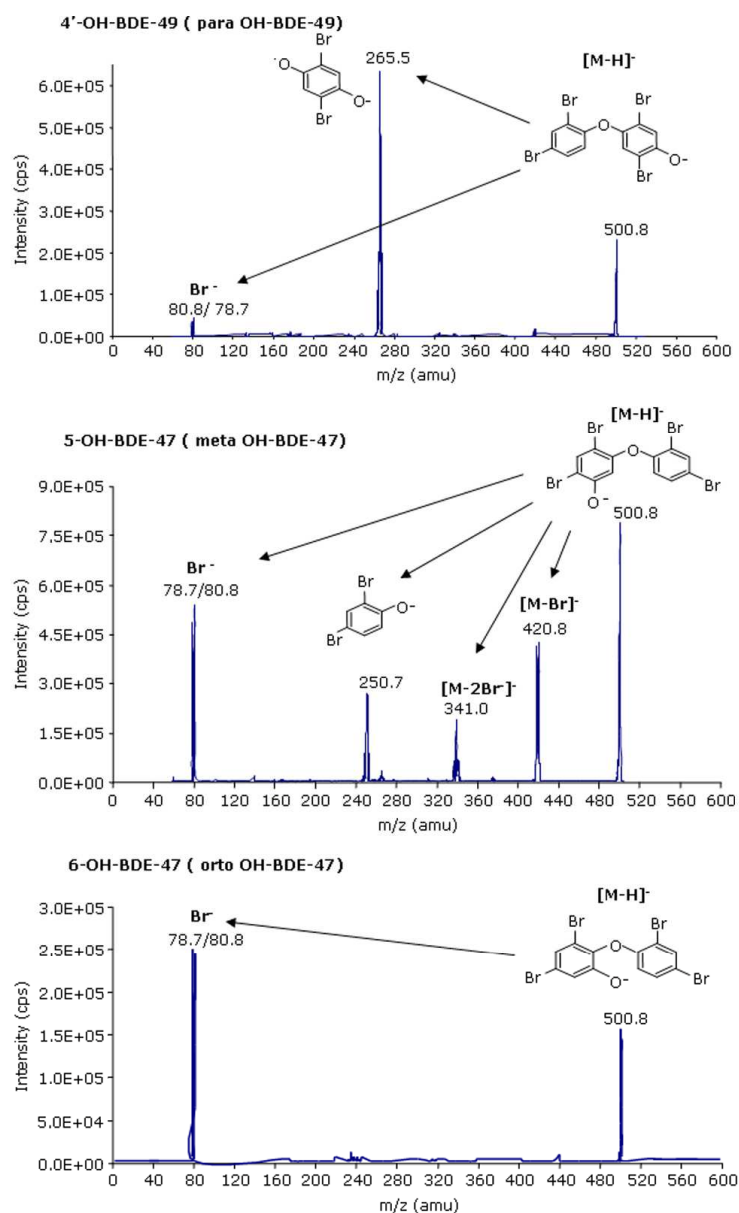


Figure 1. ISP (–) MS/MS $[M - H]^-$ mass spectra of a representative *meta*- (5-OH-BDE-47), a *para*- (4'-OH-BDE-49) and an *ortho*- (6-OH-BDE-47) substituted hydroxylated-PBDE.

2.1 mm i.d., 3.5 μ m particle size) (Waters). Among columns tested, the Waters XBridge C18 column presented the best resolution and allowed the separation of the OH-tri and OH-tetraBDE clusters. These shorter columns, compared to conventional 150 or 250 mm columns, were selected since they provide lower elution times and better optimization of

the total cycle time without sacrificing resolution. A buffered mobile phase was selected to avoid pH changes and peak doubling. Among the gradient elutions and mobile phases evaluated, binary mobile phases produced coelution of tri- and OH-tetraBDEs clusters irrespective of the column used. The use of combinations of 5 mM ammonium acetate with

Table 2. Compounds studied, chemical formula, molecular weight, base peak formed under scan LC-ISP-MS/MS, MRM, product ions and acquisition parameters used for determination of investigated OH-PBDEs

Compound	Formula	Molecular weight	[M – H] [–] (m/z)	Product ions (characterization)	MRM transition (m/z)	DP (V)	CE (V)
3'-OH-BDE-7	C ₁₂ H ₈ Br ₂ O ₂	343.9	342.8	261.0 [C ₁₂ H ₇ BrO ₂] [–] 250.7 [C ₆ H ₅ Br ₂ O] [–] 78.7 [Br] [–]	342.8 → 261.0 ^a	–60	–22
3'-OH-BDE-28	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O ₂	422.9	421.0	340.9 [C ₁₂ H ₆ Br ₂ O ₂] [–] 261.0 [C ₁₂ H ₆ BrO ₂] [–] 250.7 [C ₆ H ₅ Br ₂ O] [–] 80.8 [Br] [–]	421.0 → 340.9 ^a 421.0 → 78.7	–70 –60	–29 –29
4'-OH-BDE-17	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O ₂	422.9	421.0	185.7 [C ₆ H ₅ BrO ₂] [–] 78.7 [Br] [–]	421.0 → 185.7 ^a 421.0 → 78.7	–60 –60	–37 –29
2'-OH-BDE-28	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O ₂	422.9	421.0	80.8 [Br] [–] 78.7 [Br] [–]	421.0 → 78.7 ^a	–60	–29
3-OH-BDE-47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O ₂	501.8	500.8	420.8 [C ₁₂ H ₅ Br ₃ O ₂] [–] 339.0 [C ₁₂ H ₅ Br ₂ O ₂] [–] 250.7 [C ₆ H ₅ Br ₂ O] [–] 80.8 [Br] [–]	500.8 → 80.8 ^a 500.8 → 78.7	–60 –35	–70 –40
5-OH-BDE-47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O ₂	501.8	500.8	420.8 [C ₁₂ H ₅ Br ₃ O ₂] [–] 339.0 [C ₁₂ H ₅ Br ₂ O ₂] [–] 250.7 [C ₆ H ₅ Br ₂ O] [–] 80.8 [Br] [–]	500.8 → 80.8 ^a 500.8 → 78.7	–60 –35	–70 –40
4'-OH-BDE-49	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O ₂	501.8	500.8	265.5 [C ₆ H ₂ Br ₂ O ₂] [–] 80.8 [Br] [–]	500.8 → 265.5 ^a 500.8 → 80.8	–60 –60	–45 –70
6-OH-BDE-47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O ₂	501.8	500.8	80.8 [Br] [–] 78.7 [Br] [–]	500.8 → 80.8 500.8 → 78.7 ^a	–60 –35	–70 –40

^a MRM transition used for quantification.

2% 2-propanol, 2% acetone or 2% 1-methoxy-2-propanol acetate with methanol and acetonitrile did not resolve any of these coelutions, even though the chromatographic conditions were modified from isocratic to gradient elution. Finally, the ternary mixture of 5 mM ammonium acetate, acetonitrile and methanol provided the best resolution and shorter retention times, although the separation was further optimized to resolve the tri- and OH-tetraBDEs clusters. Different proportions of organic phase, as well as various gradient slopes (duration and curving), were considered. Figure 2 shows the total ion current TIC chromatogram in the MRM mode, and also the characteristic transitions of a standard mixture of the 8 OH-PBDEs and the internal standard. Good resolution (≥ 1) values for all adjacent chromatographic peaks were achieved except for the resolution between 5-OH-BDE-47 and 4'-OH-BDE-49 which presented a resolution value of 0.75.

Accordingly, it was possible to quantify all compounds individually: even the coelution of 3-OH-BDE-28 and 4'-OH-BDE-17, which were resolved by the selective MRM transition.

Quantification and quality parameters

Calibration curves were constructed for each of the OH-PBDEs by both external and internal standard (using *d*₄-BPA as internal standard) calibration. The linear calibration range

studied was from 25 to 650 pg μL^{-1} . In all cases, good values of the correlation coefficient (higher than 0.99) were obtained within the interval studied, indicating excellent linearity over the environmentally relevant concentration range studied.

In order to evaluate the performance of the optimized LC-ISP-MS/MS approach for OH-PBDEs, other quality parameters such as linearity, intra- and inter-assay variation and sensitivity were studied. The results are listed in Table 3. Using five consecutive injections of the 75 pg μL^{-1} standard solution and the quantitative methods previously proposed (external and internal calibration), the intra-assay relative standard deviation (%RSD) was $<10\%$ for all compounds, independent of the quantification procedure.

Using the same standard solution, the inter-assay variation was calculated by injecting the solution on four consecutive days. Similar quantitative analyses were applied to the intra-assay variation study. As expected, the %RSD obtained for the inter-assay variation were higher than those obtained for the intra-assay variation. The RSD% values obtained using internal standard calibration were better ($\leq 10\%$) than those obtained using external standard calibration ($\leq 27\%$). With internal standard quantification, the variation of the LC-MS/MS response and the injection variations were corrected and more precise data were obtained. However, the low response of the internal standard *d*₄-BPA

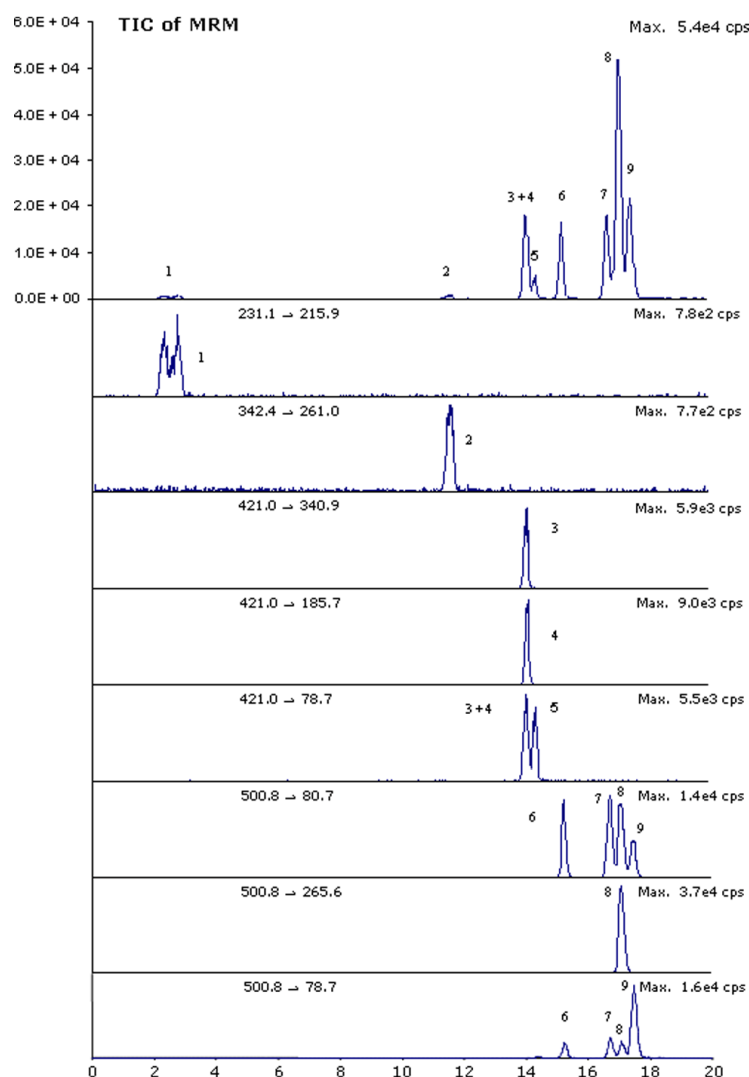


Figure 2. Total ion chromatogram (TIC) in MRM mode at $375 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$, and characteristic transitions of a standard mixture of 8 OH-PBDEs and the internal standard. d_4 -BPA (1), 3'-OH-BDE-7 (2), 3'-OH-BDE-28 (3), 4'-OH-BDE-17 (4), 2'-OH-BDE-28 (5), 3-OH-BDE-47 (6), 5-OH-BDE-47 (7), 4'-OH-BDE-49 (8) and 6-OH-BDE-47 (9).

in comparison to OH-PBDEs implies that it should be added at a 10-fold higher concentration, or else be replaced by a more electronegative compound, such as deuterated 2,4,6 trichlorophenol, ^{13}C -tetrabromobisphenol A or the recently available ^{13}C OH-PBDEs.

LOQ, defined as the minimum concentration that can be analyzed or quantified with precision with a signal-to-noise ratio of 10, was calculated for each compound, and values between 0.6 and $4.6 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ were obtained. The better response of either tri- or tetra-brominated compounds as compared to that of congeners containing two bromine

atoms might be due to the stabilization of the charge under ISP (–) for the more acidic compounds.

Method performance using environmental samples

Table 4 reports the LOQ and percentage of the ISP(–) enhancement/suppression in soil, fish, sludge and particulate matter extracts. The LOQ values at a spiking concentration of $25 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ were between 44.7 and 475 pg g^{-1} . The results achieved were similar to those obtained for the standard solution. This indicates that the ISP(–)-LC-MS/MS approach provides high sensitivity for all the investigated

Table 3. Compounds studied ordered by retention time, quantification limits (LOQ) and intra- and inter-assay variations calculated at a concentration of 75 pg μL^{-1} using both external and internal standard quantification

Compound	Retention time (min) (%RSD, $n = 5$)	LOQ (pg μL^{-1})	Intra-assay variation (%RSD, $n = 5$)		Inter-assay variation (%RSD, $n = 4$)	
			External Cal.	Internal Cal.	External Cal.	Internal Cal.
3'-OH-BDE-7	11.8 (0.8)	4.6	5	7	23	9
3'-OH-BDE-28	14.3 (0.6)	1.3	6	9	12	10
4'-OH-BDE-17	14.3 (0.8)	0.8	3	4	5	8
2'-OH-BDE-28	14.5 (0.7)	0.9	8	7	9	7
3-OH-BDE-47	15.5 (0.7)	1.1	9	6	27	6
5-OH-BDE-47	17.0 (0.9)	0.8	6	7	5	6
4'-OH-BDE-49	17.3 (1.1)	0.6	6	6	7	6
6-OH-BDE-47	17.7 (1.0)	0.7	4	4	14	8

Table 4. Quantification limits (LOQ in pg g^{-1} dw) and percentage of ISP (–) enhancement/suppression measure (ISP(–) E/S) at 25 and 375 pg μL^{-1} for each OH-PBDEs in the spiked soil, fish, sludge and particulate matter samples

Compound	Soil			Fish			Sludge			Particulate matter		
	LOQ	ISP(–)E/S		LOQ	ISP(–)E/S		LOQ	ISP(–)E/S		LOQ	ISP(–)E/S	
		25	375		25	375		25	375		25	375
3'-OH-BDE-7	262	105	94	239	98	117	254	104	126	475	78	113
3'-OH-BDE-28	93.7	87	103	110	117	107	142	125	128	175	89	114
4'-OH-BDE-17	55.2	98	108	77.3	118	116	64.5	132	129	108	99	108
2'-OH-BDE-28	82.6	115	90	93.6	118	98	84.7	131	122	84.1	81	101
3-OH-BDE-47	94.1	92	102	88.3	85	103	88.4	104	124	90.5	121	113
5-OH-BDE-47	91.6	86	101	57.9	107	102	74.8	96	120	70.3	124	113
4'-OH-BDE-49	48.8	87	99	44.7	107	97	87.7	116	117	69.2	127	100
6-OH-BDE-47	55.2	76	99	53.1	100	100	84.7	107	120	80.4	111	108

analytes in complex matrices, provided that an efficient clean-up step is performed. Among the matrices studied, sludge and particulate matter presented higher LOQs.

A well-known problem when analyzing organic compounds in environmental matrices and LC-MS is that the coelution of matrix components may reduce or enhance the ion intensity of the analytes and affect the accuracy of the quantitative analysis. The ISP(–) enhancement/suppression (ISP(–)E/S) was assessed as an indicator of the selectivity and sensitivity of the proposed method. At a spiking level of 25 and 375 pg μL^{-1} , the percentage ISP(–)E/S of the peak areas of the eight OH-PBDEs in the different matrices were compared with the peak areas of each target compound in the standard solution at the same concentration. Percentage ISP(–)E/S values higher than 100% indicate some ISP(–) enhancement due to the matrix effects. In the samples studied, the percentage (ISP(–)E/S) varied from 76 to 132%, and sludge had the highest enhancement of the signal (from 96 to 132%) and this was attributed to the high total organic content of this sample. There was no significant difference between low and high spiking levels, indicating that the LC-MS/MS response is highly sensitive and selective at these concentration levels. If present,

the ISP(–)E/S can be compensated with the internal standard quantification procedure, which in the present study underwent the same ISP(–)E/S effect as the target compounds.

No losses in resolution were observed between OH-PBDEs in the samples tested, thus indicating the efficiency of the chromatographic method developed. In addition, the repeatability of the method was equal to that of the standard mixtures. Furthermore, no memory effects between consecutive runs at the spiking concentration used were observed and no traces of the studied compounds were found in blank samples.

The spiking experiments using environmental samples prove that excellent selectivity and sensitivity can be achieved and suggest the potential use of this methodology to determine OH-PBDEs at the picogram level concentrations normally reported in the literature. Thus, among the different studies revised, the concentration of OH-PBDEs was found to vary between 2.7 and 198 pg g^{-1} w/w in fish plasma,²¹ between 310 and 920 pg g^{-1} w/w in plasma of *Haliaeetus leucocephalus*²⁴ and between 120 and 790 pg g^{-1} w/w in plasma of Glaucous Gulls.²⁷ These concentration levels could be monitored with the analytical method described in the

present study and without the need of a derivatization step prior to injection.

CONCLUSIONS

The developed LC-ISP-MS/MS method proved to be an efficient, robust, sensitive and selective tool for the determination of eight underivatized OH-di to OH-tetraBDEs in soil, fish, sludge and particulate matter. Using three identification points (retention time and, when possible, two MRM transitions) and optimized LC and MS/MS conditions, LOQ at the high picogram per gram dry weight level and acceptable intra- and interday variation were obtained for both standard mixtures and environmental samples. The slight ion enhancement/suppression that was observed could be compensated with the use of internal standard quantification. The methodology proposed here is worth considering as an alternative strategy for the direct determination of OH-PBDEs without the need for derivatization. This simpler methodology will permit widening the studies dealing with the source, metabolism and fate of PBDEs with the aim of assessing in depth the risks associated with OH-PBDEs in environmental matrices.

Acknowledgements

This research has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science (project CTM2005-07402-C02-01/TECNO). Silvia Mas acknowledges a Ph.D. grant UAC 2005-0071 from the Ministry of Education and Science (Associated Unit between University of Barcelona and CSIC). Dr. Isidre Casals from the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona is acknowledged for his comments and suggestions.

REFERENCES

- Sellerstrom U, Kierkegaard A, de Wit CA, Jansson B. Polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from a Swedish river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1998; **70**: 1065 DOI: 10.1897/1551-5028(1998)017<1065:PDEAHI>2.3.CO;2.
- Rayne S, Ikononou MG. Polybrominated diphenyl ether in an advanced treatment plant. Part 2: potential effects on a unique aquatic system. *Journal of Environmental Engineering and Science* 2005; **4**: 353 DOI: 10.1139/s04-067.
- Sjodin A, Carlsson H, Thuresson K, Sjolin S, Bergman A, Ostman C. Flame retardants in indoor air at an electronic recycling plant and at other work environments. *Environmental Science and Technology* 2001; **35**: 448 DOI: 10.1021/es000077n.
- de Boer J, Van der Horst A, Wester PG. PBDEs and PBBs in suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant in- and effluents and biota from the Netherlands. *Organohalogen Compounds* 2000; **47**: 85.
- Haglund PS, Zook DR, Buser HR, Hu J. Identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers and methoxy-polybrominated diphenyl ethers in Baltic biota. *Environmental Science and Technology* 1997; **31**: 3281 DOI: 10.1021/es9702834.
- Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shmidzu Y, Ochiai F, Kida T, Miyata H. Real situation of contamination by polybrominated diphenyl ethers as flame retardant in market fish and mother milk of Japan. *Organohalogen Compounds* 2000; **47**: 218.
- de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002; **46**: 583 DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00225-9.
- Strandberg HB, Dodder NG, Basu I, Hites RS. Concentration and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and other organohalogen compounds in great lakes air. *Environmental Science and Technology* 2001; **35**: 1078 DOI: 10.1021/es001819f.
- Gouin T, Thomas GO, Cousins I, Barber J, Mackay D, Jones KC. Air-surface exchange of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology* 2002; **36**: 1426 DOI: 10.1021/es011105k.
- Kierkegaard A, Burreau S, Marsh G, Klasson-Wehler E, de Wit CA, Asplund L. Metabolism and distribution of 2,2',4,4'-tetrabromo[¹⁴C]diphenyl ether in pike (*Esox Lucius*). *Organohalogen Compounds* 2001; **52**: 58.
- Om U, Klasson-Wehler E. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica* 1998; **28**: 199.
- Hakk H, Larsen G, Klasson-Wehler E. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica* 2002; **32**: 369 DOI: 10.1080/00498250110119117.
- Marsh G, Athanasiadou M, Athanassiadis L, Sandholm A. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats. *Chemosphere* 2006; **63**: 690 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.072.
- Bergman A, Athanasiadou M, Faldt E, Jakobsson K. Hydroxylated PBDE metabolites in human blood. *Organohalogen Compounds* 2006; **68**: 635.
- Hakk H, Huwe JK, Low MC, Rutherford D, Larsen GL. Tissue disposition, excretion, and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenylether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 2006; **36**: 79.
- Bowden BF, Towerzey L, Junk PC. A new brominated diphenyl ether from the marine sponge *Dysidea Herbacea*. *Australian Journal of Chemistry* 2000; **53**: 299.
- Fu X, Schmitz FJ, Govindan M, Abbas SA, Hanson KM, Horton PA, Crews P, Laney M, Schatzman RC. Enzyme inhibitors: new and known polybrominated phenols and diphenyl ethers from four Indo-Pacific *Dysidea* sponges. *Journal of Natural Products* 1995; **58**: 1384.
- Fu X, Hossain MB, Schmitz FJ, Van der Helm D. Longithorones, unique prenylated para- and metacyclophe type quinones from tunicate aplidium longithorax. *Journal of Organic Chemistry* 1997; **62**: 3810.
- Schumacher RW, Davidson BS. Didemmolines A-D, new N9-substituted β -carboline from the marine ascidian *Didemnum* sp. *Tetrahedron* 1995; **51**: 10125.
- Malmvärn A, Marsh G, Kautsky L, Athanasiadou M, Bergman A, Asplund L. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and *Blue Mussels* from the Baltic Sea. *Environmental Science and Technology* 2005; **39**: 2990 DOI: 10.1021/es0482886.
- Valters K, Li H, Alaei M, D'Sa I, Marsh G, Bergman A, Letcher RJ. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environmental Science and Technology* 2005; **39**: 5612 DOI: 10.1021/es0506410.
- Marsh G, Athanasiadou M, Bergman A, Asplund L. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood. *Environmental Science and Technology* 2004; **39**: 10 DOI: 10.1021/es034671j.
- Hovander L, Malmberg T, Athanasiadou M, Athanassiadis I, Rahm S, Bergman A, Wehler EK. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002; **42**: 105 DOI: 10.1007/s002440010298.
- Olsson A, Ceder K, Bergman A, Helander B. Nestling Blood of the White-Tailed Sea Eagle (*Haliaeetus albicilla*) as an indicator of territorial exposure to organohalogen compounds-an evaluation. *Environmental Science and Technology* 2000; **34**: 2733 DOI: 10.1021/es991426k.
- McKinney MA, Martineau D, Dallaire AD, Béland P, De Guise S, LeBeuf M, Letcher RJ. Organohalogen contaminants and metabolites in the liver of beluga whales (*Delphinapterus leucas*)

- from two Canadian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006; **25**: 1246 DOI: 10.18997/05-284R.1.
26. Hua W, Bennett ER, Letcher RJ. Determination of triclosan in waste and surface waters from the Detroit River using high performance liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. *Environmental International* 2005; **31**: 621 DOI: 10.1016/j.envint.2004.10.019.
 27. Verreault J, Gabrielsen GH, Chu S, Muir DCG, Andersen M, Ahmad H, Letcher RJ. flame retardants and methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in two Norwegian Arctic Top Predators: Glaucous Gulls and Polar Bears. *Environmental Science and Technology* 2005; **39**: 6021 DOI: 10.1021/es050738m.

IN VITRO METABOLISM OF DECA-BROMO DIPHENYL ETHER USING RAT MICROSOMES

Mas Silvia^{1,2}, Raldua Demetrio³, de Juan Anna², Tauler Romà¹ and Lacorte Silvia¹

¹ Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

² Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain.

³ Laboratory of Environmental Toxicology, Universitat Politècnica de Catalunya, CN 150, Km. 14.5 (Institut Politècnic Campus Terrassa), 08220 Terrassa, Catalonia, Spain.

Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been extensively used as flame retardants in a wide variety of products including plastics, textiles and electronics¹. During the past years, concern has arisen due to the increasing occurrence of these products in the environment and to the proven toxic and endocrine disruptor activity of lowly brominated congeners². Among PBDEs, Deca-BDE (BDE-209) is extensively being used in Europe and its environmental fate is still uncertain. Regarding to its elimination, it has been demonstrated that BDE-209 can be degraded photochemically, producing lower brominated BDEs³. Similarly, the biotransformation of BDE-209 may lead to an increase of more active and persistent low brominated PBDEs in the environment. Little is known on the biotransformation of PBDEs in wildlife, but it was recently shown that CYP2B and, to a lesser extent, CYP1A and CYP4A3 were involved in the metabolism of some PBDE congeners by rat liver microsomes⁴. In this study, the metabolism of BDE-209 by CYP2B, CYP1A and CYP4A3 was tested using phenobarbital, β -naphthoflavone and clofibrate-treated rat liver microsomes. These enzymatic systems are involved in the detoxification of many xenobiotics, producing hydroxylation, epoxidation or other reactions in phase I metabolism, capable thus to eliminate toxic compounds. In the present study we tested their ability to biotransform BDE-209. BDE-209 is a high molecular weight compound (959.17 Da) and its bioavailability and possible metabolization in vertebrates has been questioned. Given the neurotoxic effects that BDE-209 can cause in exposed rats⁵, and their potential impact to other mammals, including men, studies on the metabolization pathways are needed for a better risk assessment. In an attempt to evaluate the debromination or hydroxylation processes during the microsomal degradation experiment, gas chromatography coupled to negative chemical ionization mass spectrometry (GC-NCI-MS) and liquid chromatography coupled to negative tandem mass spectrometry (LC-ISP(-)-MS/MS) were used.

Materials and Methods

Microsomes and Chemicals

Liver microsomes from Sprague-Dawley rats pre-treated with phenobarbital, β -naphthoflavone and clofibrate were purchased in Tebu-bio (Barcelona Science Park, Catalonia). Analytical grade decabromodiphenyl ether (98%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA). Analytical grade methanol and dimethylsulfoxide (DMSO) and GC grade hexane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The decachlorinated biphenyl (PCB 209) was purchased from Lab. Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and was used as internal standard. The remaining chemicals used in this study were reagent grade or better and were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

A stock solution of BDE-209 was prepared in DMSO at a concentration of 140 mg L⁻¹. In order to prepare the NADPH regenerating system (NRS), a stock solution A (20 mM NADP⁺/ 100 mM G6P/ 100 mM MgCl₂) and stock solution of G6PDH at 292 U mL⁻¹ were made.

Microsomal assay and sample extraction

BDE-209 metabolism was assayed by incubation with induced hepatic microsomes, as described for other PBDEs⁴, with slight modifications. Briefly, 1.5 μ M of BDE-209 was preincubated with 1 mg mL⁻¹ hepatic microsomes in a 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 5 min in a shaking water bath at 37°C (shaking at 150 rpm). After preincubation, the reaction was initiated by the addition of NRS (50 μ L solution A + 3.75 μ L G6PDH + 196.25 μ L 2% NaHCO₃) in a total incubation system volume of 1 mL. Metabolism was stopped after 30, 60 and

120 min by the addition of 2 ml ice-cold methanol. After centrifugation (1000 x g for 5 min), the supernatants were extracted three times with 2 ml diisopropyl ether by vortexing for 30 s, and then removal of the both aqueous and organic phases. The extracts were dried by evaporation under N₂, and organic residues were reconstituted in 250 µl of hexane prior to injection in GC-NCI-MS. Afterwards, the same extract and the aqueous residues were evaporated and reconstituted with 250 µl of methanol prior to injection in a HPLC-MS/MS. 100 ng of PCB 209 as internal standards was added as internal standards after stopping the reaction in order to correct the loss in the extraction procedure.

Control incubations were carried out by performing identical incubations with the BDE-209 and 250 µl of 2% NaHCO₃ added instead of NRS. In order to determine the possible degradation of BDE-209 three additional control incubations were also carried out without microsomes.

Instrumental Analysis

Gas chromatography-mass spectrometry

Gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative chemical ionization detection (GC-NCI-MS) was performed on an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Network mass spectrometer in order to analyze BDE-209 debromination or other possible biotransformation products such as methoxyBDEs. An HP-5ms capillary column (15 m x 0.25 mm i.d, 0.10 µm film thickness) containing 5% phenylmethyl siloxane (Model HP DB-5Ms) was used with helium as the carrier gas at 15 psi and ammonia was used as reagent gas in the NCI mode. The temperature program was from 120 °C (held for 1 min) to 205 °C (held for 1 min) at 6 °C min⁻¹ and then from 205 to 310 °C (held for 15 min) at 18 °C min⁻¹, using the splitless injection mode during 1 min. The ion source temperature and reagent gas pressure in the ion source were 250 °C and 1.9 10⁻⁴ Torr respectively. Full scan data acquisition was performed by scanning from m/z 75 to 800.

Liquid chromatography-mass spectrometry

Liquid chromatography coupled to negative tandem mass spectrometry (LC-ISP(-)-MS/MS) was performed on an Agilent 1100 series HPLC system (Waldbronn, Germany) connected to an API 3000 triple quadrupole MS/MS system (PE Sciex, Concord, ON, Canada) in order to analyze decaBDE hydroxylation process. HPLC Conditions and MS/MS parameters were described previously by S. Mas et al. ⁶.

Results and discussion

The biotransformation of BDE-209 was tested using rat liver microsomes enriched with CYP2B, CYP1A and CYP4A3. The proposed *in vitro* assay was optimized for BDE-209 taking into consideration the low solubility of this compound in many organic solvents and the need to use and minimize the amount of solvent in the microsomal incubations to avoid denaturisation. The selected solvent was dimethylsulfoxide (DMSO), widely used in this kind of bioassays and the solubility (per litter in DMSO) of BDE-209 was 140 mg. Regarding to the extraction efficiency, recoveries of BDE-209 without microsomes were of 92%±2, indicating that the procedure and the solvents used were adequate. Given the fact that both the aqueous layer and the solvent layer from LLE were analyzed, it was expected that both low brominated BDEs, methoxy, hydroxy or other metabolites of BDE-209 would be efficiently extracted.

Control without microsomes did not show any decrease in BDE-209 content, indicating that under the conditions used in the assays there was no significant abiotic degradation. Figure 1 shows the time-course of BDE-209 metabolism for the three P450 systems. After 30 min incubation, the BDE-209 content decreased 57%, 38% and 31% for the CYP2B, CYP1A1, and CYP4A3 enriched microsomes, respectively. The decrease observed in the BDE-209 content is an indirect evidence of the metabolism of this compound by the cytochrome P450. A period incubation of BDE-209 with phenobarbital (CYP2B) presented the highest metabolism and lower DecaBDE depletion was found in the microsomal incubation with β-naphthoflavone (CYP1A) and clofibrate (CYP4A3). These results are in good agreement with previous studies that have shown that CYP2B and to a lesser extent CYP1A and CYP4A3 were involved in the metabolism of some PBDE congeners⁴. The higher activity of CYP2B is related to the fact that BDE-209 is a non-planar lipophilic molecule, common characteristics to induce the CYP2B enzyme system⁷. No further decrease of BDE-209 content was observed between 30 min and 120 min incubation time.

Although we observed decay in the BDE-209 concentration, in the GC-NCI-MS analysis only the peaks of PCB-209 (IS), BDE-209 and some decomposition products of BDE-209, due to its instability to high temperatures, were found. This analysis revealed the total absence of any debromination product. These results are in accordance to Benedict et al.⁸ who suggested that cytochrom P-450 enzymes were not the main debromination pathway for BDE-99. However, when microsomes were co-incubated with reverse thyronine, catalytic mediation via thyroid hormone deiodinases was found, generating BDE-47. In those studies, carp microsomes were used with 1 h incubation.

Additionally, we used LC-ISP(-)-MS/MS to determine the formation of any hydroxyl-BDE. The system was optimized to determine from di to tetra hydroxyl-BDEs⁶ but no metabolites of this bromination level were detected. Given the recent availability of a large number of hydroxyl-BDE of different bromination levels, from penta to nona hydroxyl BDEs will be analyzed after the method is set up. Another possibility is that metabolites may be covalently bound to macromolecules, either protein or lipids, as indicated by Mörck et al. when analyzing the metabolism of BDE-209 in rats⁹. This indicates the need to determine and identify the BDE-209 phase I metabolites considering the possible interaction with cell components.

The fact that CYP2B can lead to a partial biotransformation of BDE-209 without formation of debrominated or hydroxylated compounds have important toxicological implications in mammals. On one hand, BDE-209 has been described as a developmental neurotoxicant that can produce long-term behavioral changes following a discrete period of neonatal exposure¹⁰. Administration of decaBDE to male rats at 3 days of age in another study was shown to disrupt normal spontaneous behavior at 2 months of age¹¹. It has also been reported that lower brominated BDEs, such as BDE-47 may be recalcitrant in the environment and possess the ability to interfere with the thyroid hormonal system. Fewer studies have been performed on OH- PBDEs in mammals, although it is thought that PBDEs can compete with the binding of T4 to plasma thyroid hormone- transporter transthyretin (TTR) only when hydroxylated⁴. 6-OH-BDE 47, detected in vivo in human plasma¹² can bind to TTR with a relatively high affinity¹³. Accordingly, future studies will be enfaced to evaluate the biotransformation routes of BDE-209 by widening the spectra of possible metabolites or adducts formed.

Acknowledgements

This research has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science (projects CTM2005-07402-C02-01/TECNO and CTQ2006_15052_C02_1/BQU). Silvia Mas acknowledges a PhD grant UAC 2005-0071 from the Ministry of Education and Science (Associated Unit between University of Barcelona and CSIC).

References

1. World Health Organization 1994.
2. de Wit, C.A. *Chemosphere* 1991; 46: 583.
3. Mas, S., de Juan, A., Lacorte, S., Tauler, R. *Analytica Chimica Acta* 2008; 618(1):18.
4. Meerts, I.A.T.M., van Zanden, J.J., Luijks, E.A.C., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, A., Brouwer, A. *Toxicological Sciences* 2000; 56: 95.
5. Viberg, H., Fredriksson, A., Jakobsson, E., Örn, U., Eriksson, P., *Toxicological Sciences* 2003; 76:112
6. Mas, S., Jáuregui, O., Rubio, F., de Juan, A., Tauler, R., Lacorte, S. *Journal of Mass Spectrometry* 2007; 42:890.
7. Lewis, D.F.V., Eddershaw, P.J., Dickins, M., Tarbit, M.H., Goldfarb, P.S, *Chemico-Biological Interactions* 1998; 115:175
8. Benedict, R.T., Stapleton, H.M., Letcher, R.J., Mitchelmore, C.L. *Chemosphere* 2007; 69:987
9. Mörck, A., Hakk, H., Örn, U., Wheler, E. K., *Drug Metabolism and Deposition* 2003; 31:900
10. Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Thompson, W.D., Warkowski, V.P., *Neurotoxicology and Teratology* 2007; 29:511.
11. Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P., *Neurotoxicology* 2007; 28:136.
12. Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, Å., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002; 42:105.
13. Legner, J., Cenijn, P. H., Malmberg, T., Bergman, Å., Brower, A., *Organohalogen. Compounds* 2002; 56:53.

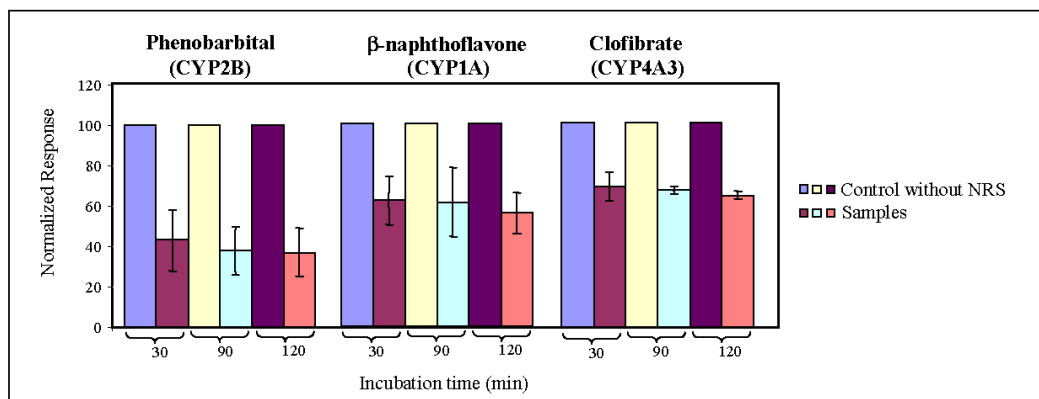


Figure 1. Time-course of BDE-209 metabolism using CYP2B, CYP1A1, and CYP4A3 enriched microsomes.

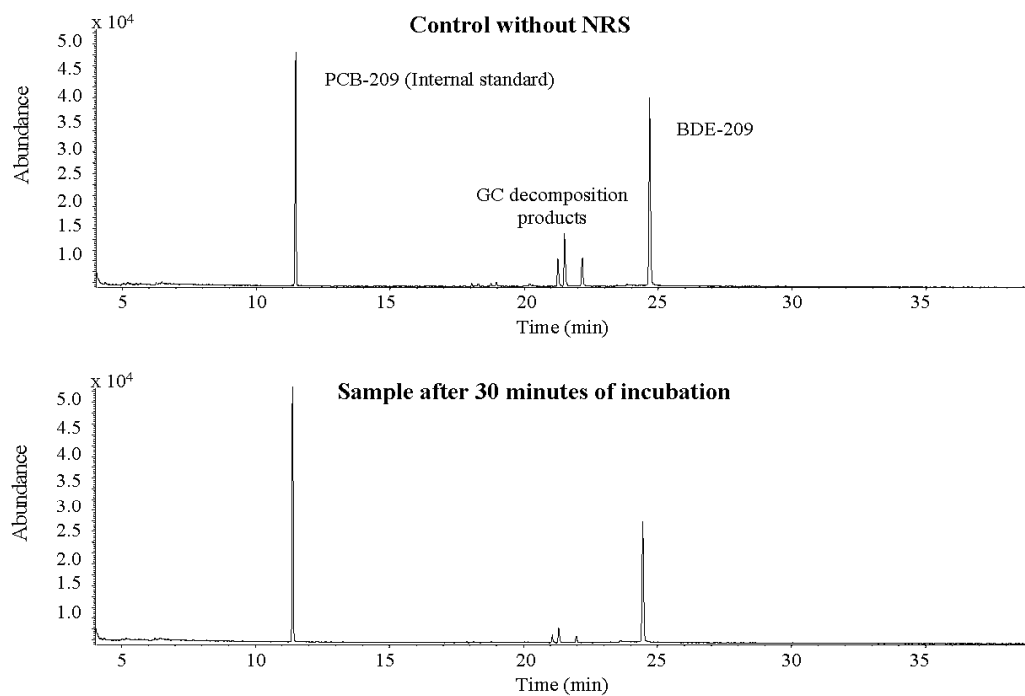


Figure 2. GC-MS analysis of BDE-209 metabolites in case of using phenobarbital Rat liver microsoma.

5.2.1. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

En aquest apartat es presenta una discussió global dels treballs complementària a la que es pot trobar en els articles. Els objectius comuns i generals d'aquest bloc són:

- ✓ El seguiment i la interpretació dels processos de foto i biodegradació del producte comercial DecaBDE.
- ✓ La caracterització dels possibles productes de degradació del DecaBDE.

La discussió s'ha dividit en dos subapartats. En el primer apartat es realitza la discussió de l'estudi de fotodegradació del producte comercial DecaBDE (Article 5.2-I) i en el segon apartat es duu a terme la discussió dels estudis de biodegradació d'aquest congènere (Articles 5.2-II i 5.2-III).

5.2.1.1. ESTUDI DE FOTODEGRADACIÓ DEL DecaBDE

Com s'ha comentat en la secció d'introducció, el producte comercial DecaBDE és actualment el PBDE més utilitzat, però els congèneres amb un nombre més petit de broms són els més trobats en el medi ambient. Per tant, existeix certa evidència que els PBDE amb un nombre elevat de broms es degraden a congèneres amb un nombre més petit de broms (més tòxics i prohibits per la UE) sota certes condicions, com ara l'exposició a la llum. D'aquí ve la importància d'entendre el mecanisme de fotodegradació del DecaBDE.

Seguint la metodologia experimental i quimiomètrica proposada en la secció 5.1.1.2, s'ha estudiat la fotodegradació del DecaBDE mitjançant espectroscòpia d'absorció molecular UV. Degut a la baixa solubilitat del

DecaBDE en aigua, els experiments de fotòlisi es van dur a terme en mescles de tetrahidrofurà/aigua. Per tal d'avaluar l'efecte de la polaritat del solvent en la cinètica de degradació es van realitzar diversos experiments amb diferents composicions de les mescles hidroorgàniques (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, % (v/v) tetrahidrofurà:aigua). D'aquesta manera, un cop entès l'efecte de la polaritat, es poden extrapolar conclusions sobre la fotodegradació del DecaBDE en medi aquós, és a dir, en el medi ambient.

Seguint l'esquema metodològic proposat en la secció anterior, es podrien realitzar els experiments de seguiment per cromatografia de líquids amb doble detecció (DAD i MS) per a veure si es resolen el mateix nombre de compostos que amb l'experiment d'espectroscòpia i d'aquesta manera complementar l'estudi. No obstant això, degut a la baixa solubilitat del DecaBDE i al seu caràcter semivolàtil, es va optar per l'ús de la cromatografia de gasos amb l'objectiu d'ampliar els resultats obtinguts per espectroscòpia d'absorció molecular i caracteritzar els possibles productes de degradació.

Els objectius específics d'aquesta secció han estat:

- ✓ La descripció detallada del procés de fotodegradació del DecaBDE, que inclou l'elucidació del seu mecanisme i la caracterització dels fotoproductes formats.
- ✓ L'ús d'acoblements multiexperiment i la seva anàlisi simultània mitjançant HS-MCR per tal d'avaluar l'efecte de la polaritat en la cinètica de degradació.
- ✓ L'adaptació del mètode HS-MCR per a incloure la possibilitat d'aplicar diferents models cinètics globals a conjunts d'experiments.

A continuació es discuteixen els resultats obtinguts per espectroscòpia i per cromatografia de gasos associats a l'estudi de la fotodegradació del DecaBDE.

5.2.1.1.1. SEGUIMENT CINÈTIC PER ESPECTROSCÒPIA D'ABSORCIÓ MOLECULAR

L'anàlisi exploratòria de les matrius individuals d'experiments de fotodegradació del DecaBDE realitzats en diferents mescles hidroorgàniques mitjançant MCR-ALS va permetre modelar quatre contribucions per a totes les fotodegradacions realitzades en els diferents medis. Es van obtenir resultats amb un percentatge de variància explicada superior al 99 %. Resolucions amb un nombre inferior o superior d'espècies no van donar resultats millors ni més interpretables. En la Figura 5.2-1 es mostren els perfils cinètics i espectrals per a experiments individuals realitzats en les diferents mescles tetrahidrofurà/aigua.

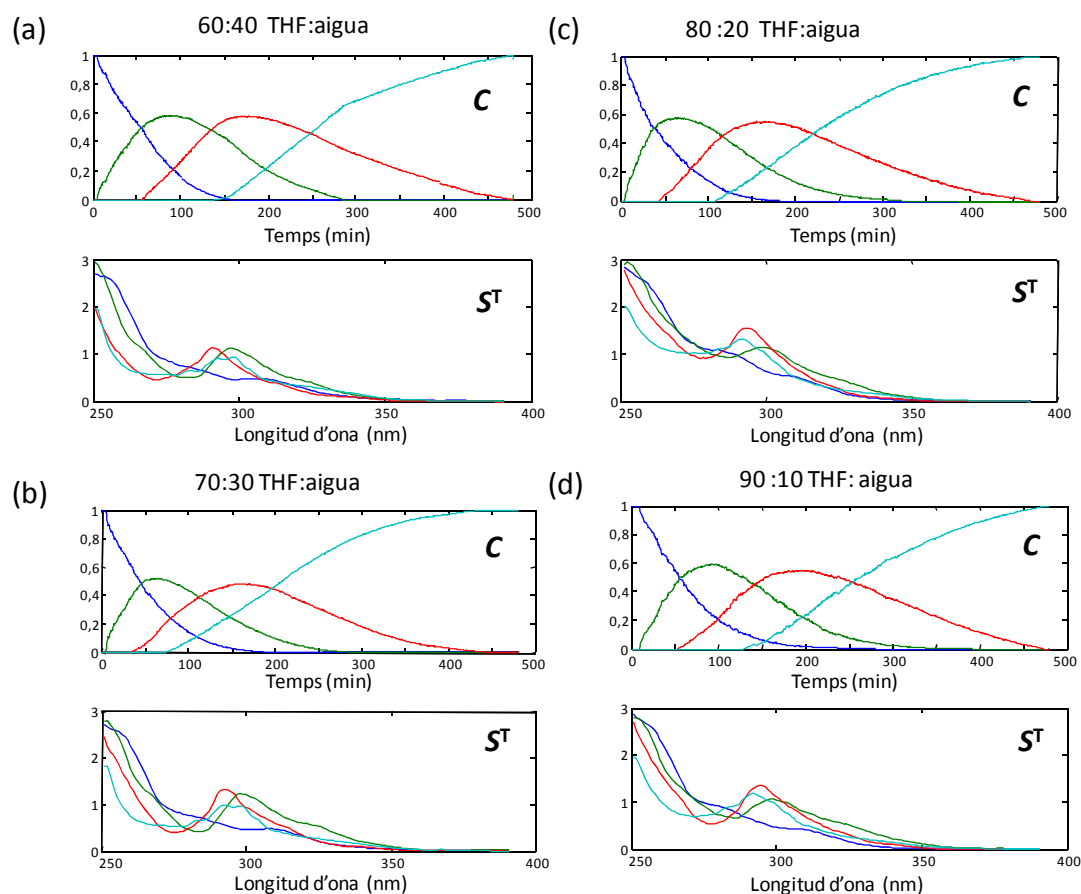


Figura 5.2-1. Perfils cinètics (C) i espectrals (S^T) resultats mitjançant MCR-ALS dels experiments de fotodegradació en les mescles THF:aigua (% v/v): (a) 40:60, (b) 30:70, (c) 20:80 i (d) 10:90.

A partir dels perfils cinètics resultats que s'observen en la Figura 5.2-1 es va poder suggerir un mecanisme de degradació consistent en un sistema de reaccions consecutives de primer ordre: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$ per a tots els experiments realitzats en les diferents mescles tetrahidrofurà:aigua. La identitat de les contribucions resoltes podria correspondre a congèneres amb menor nombre de broms, però cal tenir en compte que l'efecte de la llum sobre el DecaBDE pot produir també dibenzofurans polibromats (PBDF), tal i com s'ha descrit en el capítol d'introducció. A més, els màxims a 280-300 nm

que s'observen en els espectres resolts (vegeu Figura 5.2-1) són típics dels PBDF [Palm, 2004], la qual cosa suggereix la formació d'aquests compostos entre els productes de degradació [Hagberg, 2006; Kajiware, 2008, Christiansson, 2009; Söderström, 2004].

L'anàlisi individual dels experiments anteriors mitjançant HS-MCR; forçant els perfils de concentració a seguir el model cinètic esmentat anteriorment, va proporcionar resultats amb una variància explicada superior al 99 % per a tots els experiments. D'aquesta manera es confirma el mecanisme escollit, s'obtenen resultats amb menys ambigüïtat rotacional i, a més, s'obtenen les constants de fotodegradació.

En la taula 5.2-1 es recullen els resultats obtinguts en la resolució individuals d'experiments de fotodegradació del DecaBDE realitzats a les diferents proporcions d'aigua en el solvent mitjançant MCR-ALS i HS-MCR.

Taula 5.2-1. Resultats de la resolució d'experiments individuals de degradació de DecaBDE en diferents mescles tetrahidrofurà/aigua mitjançant MCR-ALS i HS-MCR.

Composició	Resolució	%LOF*	Paràmetres cinètics, k_i ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)
60:40 THF:aigua	MCR-ALS	0,84	----
	HS-MCR	1,01	$k_1 = 2,40; k_2 = 2,15; k_3 = 1,64$
70:30 THF:aigua	MCR-ALS	1,35	----
	HS-MCR	1,41	$k_1 = 2,43; k_2 = 1,57; k_3 = 0,90$
80:20 THF:aigua	MCR-ALS	0,89	----
	HS-MCR	0,65	$k_1 = 2,49; k_2 = 1,96; k_3 = 1,42$
90:10 THF:aigua	MCR-ALS	1,46	----
	HS-MCR	1,76	$k_1 = 3,32; k_2 = 3,17; k_3 = 2,67$

* % LOF: manca d'ajust del model (%)

A partir de les constants que es recullen en la Taula 5.2-1 es pot intentar fer una primera interpretació de l'efecte de la polaritat del solvent en la cinètica

de degradació. Semblaria que en disminuir la proporció d'aigua en el solvent hi ha un lleuger augment en la velocitat de la fotodegradació, però aquests resultats són preliminars ja que procedeixen de l'anàlisi individual d'experiments.

És ben sabut que l'ús d'experiments replicats i l'anàlisi posterior de les estructures multiconjunt que se'n deriven proporciona resultats més robustos, fiables i acurats. En aquest cas, però, els experiments s'han realitzat en diferents medis i cal considerar si és viable una anàlisi multiconjunt.

En observar els espectres resolts de cadascuna de les espècies químiques en els diferents experiments es veu que tenen formes molt similars per a totes les composicions de solvent (vegeu Figura 5.2-1). A més, l'anàlisi de rang de l'estructura multiconjunt construïda a partir de les matrius corresponents als replicats de totes les composicions de solvent indica que es necessiten entre quatre i cinc contribucions per a descriure el sistema. Aquests dos fets suggereixen la possibilitat d'analitzar simultàniament tots aquests experiments.

Es va realitzar una primera anàlisi simultània amb MCR-ALS dels experiments per triplicat realitzats a diferents composicions de solvent. A partir d'aquesta resolució (vegeu Figura 5 de l'article 5.2-I) es va observar que es necessitaven cinc contribucions per tal de poder modelar bé el conjunt de dades, tal i com ja indicava l'anàlisi de rang de l'estructura multiconjunt. Quatre d'aquestes contribucions corresponen al producte original (A) i tres compostos de degradació (B, C i D), la qual cosa permet confirmar que l'evolució del procés de fotodegradació del DecaBDE en els diferents experiments es descriu mitjançant quatre components. La cinquena contribució (E) no està involucrada en el procés de degradació i podria tenir diferents orígens, tals

com: diferències associades a la correcció de la línia de base i, principalment, petites variacions en les formes dels espectres d'una mateixa espècie degudes a la variació de la composició del solvent. Per a poder contrarestar aquestes petites diferències és necessària la inclusió d'aquesta contribució espectral addicional, que no s'associa a un component del procés de fotodegradació. El resultat obtingut presenta una variància explicada superior al 99% i la inclusió d'aquesta contribució addicional proporciona perfils espectrals i cinètics més interpretables.

A continuació, es va realitzar l'anàlisi simultània dels replicats dels diferents experiments mitjançant modelització híbrida HS-MCR. Tal com es mostra en la Figura 5.2.2, HS-MCR es va aplicar de dues formes diferents:

- a) Ajustant els perfils de concentració de cada experiment de manera individual a un model cinètic. Aquest ajust independent es fa per a detectar la presència de replicats anòmals i procedir a la seva eliminació en cas necessari.
- b) Ajustant tots els replicats d'una mateixa composició a un únic model global. D'aquesta manera s'obtenen estimacions de les constants cinètiques més acurades i fiables.

Aquesta segona modalitat és una millora que es va introduir per primer cop en l'algorisme HS-MCR associada a aquest treball, ja que en versions anteriors cada experiment s'ajustava separadament a un mòbil cinètic.

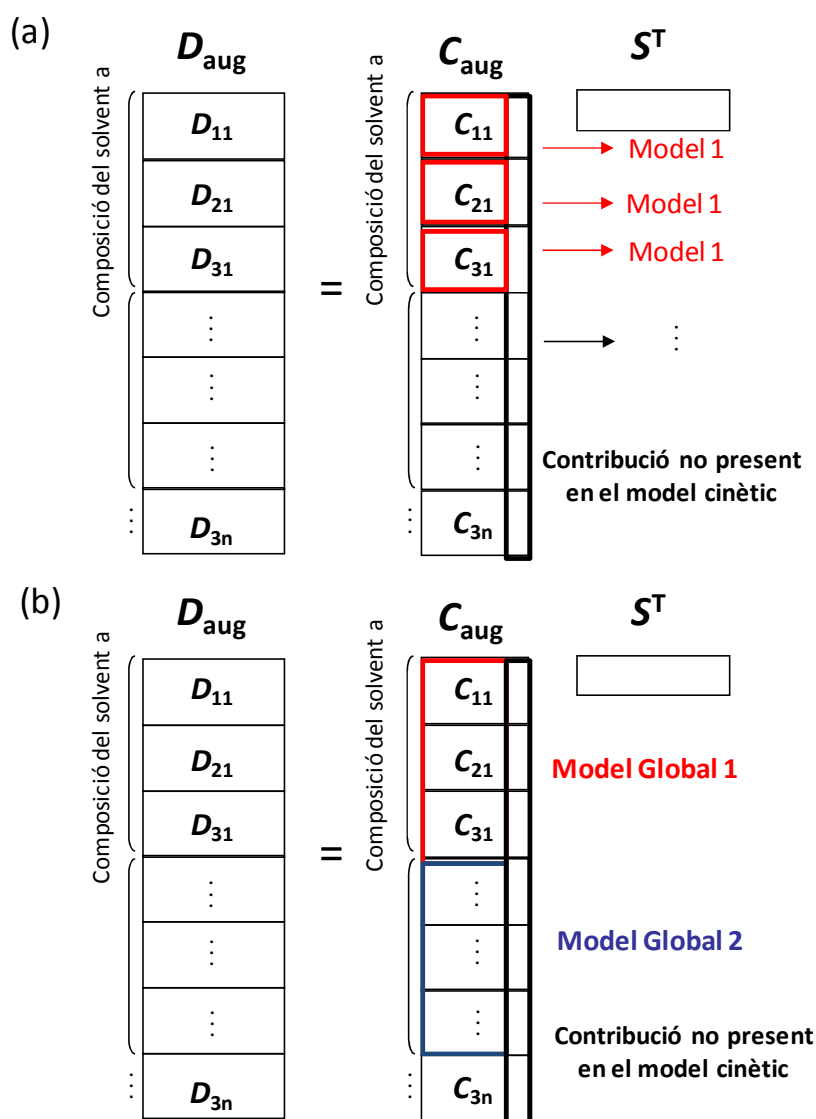


Figura 5.2-2. (a) Estratègia mètode HS-MCR amb ajust cinètic individual. (b) Estratègia mètode HS-MCR amb submodels cinètics globals.

En l'ús de les dues modalitats de HS-MCR, les espècies A, B, C i D necessàries per a descriure el procés de fotodegradació del DecaBDE s'ajusten a un model cinètic individual o global (relacionat amb cadascuna de les composicions de solvent) i l'espècie E, que no és present en el model cinètic, però que presenta resposta instrumental, es modela de manera flexible.

La Figura 5.2-3 mostra l'anàlisi multiconjunt de tots els experiments mitjançant HS-MCR amb ajust cinètic individual per a cada experiment.

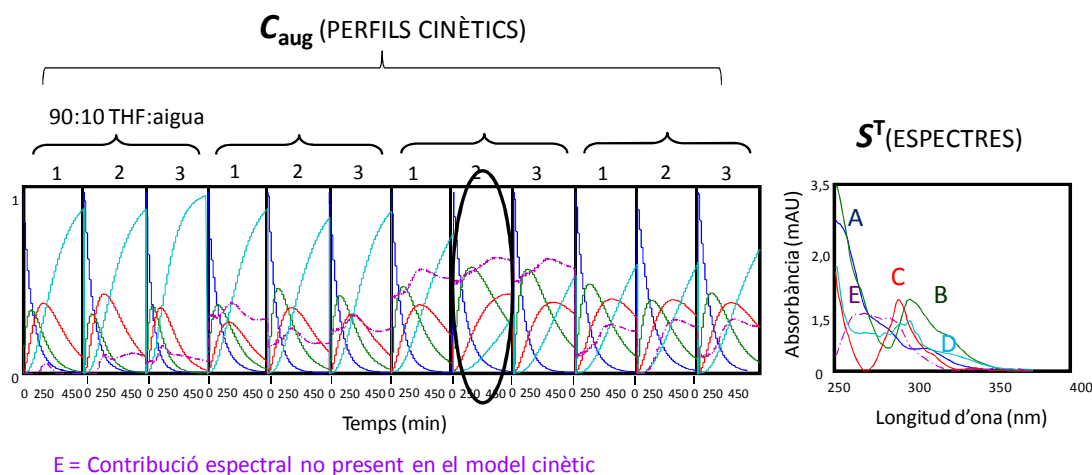


Figura 5.2-3. Resultats de l'anàlisi dels replicats dels experiments realitzats en les diferents mescles mitjançant HS-MCR amb ajust cinètic individual per a cada experiment. El replicat encerclat és el que presenta un comportament anòmal.

A partir dels perfils de concentració resolts es pot observar com el segon replicat de la mescla 70:30 tetrahidrofurà:aigua presenta un comportament diferent al dels altres dos replicats. A més, si s'observa les constants cinètiques obtingudes per a cada replicat en els diferents experiments (vegeu Taula 1 de l'article 5.2-I) es veu clarament que aquest replicat presenta un comportament atípic.

Un cop eliminat el replicat atípic es va procedir a fer l'anàlisi mitjançant el mètode HS-MCR amb submodels cinètics globals. La Figura 6 de l'article 5.2-I mostra els perfils cinètics i els espectres purs resultants d'aquesta resolució. La Taula 5.2-2 mostra les constants de velocitat obtingudes per als models globals ajustats a les sèries de replicats de cada composició de solvent.

Taula 5.2-2. Resultats de la resolució simultània mitjançant HS-MCR amb submodels cinètics globals dels replicats dels experiments de fotodegradació del DecaBDE realitzats en les diferents mesclures tetrahidrofurà/aigua.

Composició	$k_1 \text{ (x } 10^{-4} \text{ s}^{-1})^*$	$k_2 \text{ (x } 10^{-4} \text{ s}^{-1})^*$	$k_3 \text{ (x } 10^{-4} \text{ s}^{-1})^*$
90:10 THF:aigua	2,76 (1)	2,60 (2)	1,38 (6)
80:20 THF:aigua	2,448(8)	1,613(5)	1,362 (4)
70:30 THF:aigua	2,41 (1)	0,99 (4)	0,77 (4)
60:40 THF:aigua	1,93 (6)	1,092 (3)	0,68 (2)

* Els valors entre parèntesis representen l'error associat a la constant ajustada.

A partir dels valors de les constants cinètiques es pot observar la clara tendència de la disminució de la velocitat de degradació del DecaBDE amb l'augment de proporció d'aigua en la mescla solvent, tal i com semblava intuir-se amb l'anàlisi individual dels experiments. Aquest fet ha estat constatat per altres autors [Ahn, 2006; Bezares-Cruz, 2004; Hua, 2003; Ohta, 2001; Söderström, 2004; Watanabe, 1897; Barcellós de Rosa, 2003]. A més, si s'accepta la hipòtesi que el mecanisme suposa la pèrdua successiva d'àtoms de brom i que l'ordre de magnitud de les constants és $k_1 > k_2 > k_3$ en totes les composicions de solvent, es pot concloure que la velocitat de fotodegradació dels PBDE augmenta amb el grau de bromació. Cal remarcar que la forma dels espectres purs suggereix també la possibilitat de la formació simultània de PBDF entre els productes de degradació com ja s'ha comentat anteriorment [Palm, 2004]. La caracterització dels productes caldrà fer-la amb GC-MS.

L'ordre de magnitud de les constants obtingudes no dista gaire de les descrites en la bibliografia [Bezares-Cruz, 2004; Eriksson, 2004; Barcellós de Rosa, 2003]. No obstant això, els estudis d'altres autors proporcionen un únic valor de constant de fotodegradació per a cada PBDE i ometen els passos successius de degradació i els valors de les seves constants cinètiques. En canvi, en aquest treball s'intenta fer una descripció més detallada del procés de fotodegradació

dels PBDE amb un mecanisme que inclogui totes les etapes cinètiques successives i el valor de les seves constants.

A partir de les constants de fotodegradació obtingudes en aquest estudi s'ha pogut fer una estimació de les constants associades al procés de fotodegradació del DecaBDE en aigua. Si representem els logaritmes de les constants en funció del percentatge de tetrahidrofurà en el solvent i extrapolem per a un valor de percentatge de tetrahidrofurà igual a zero, s'obté una estimació del valor de les constants cinètiques en aigua, que és la següent:

$$k_1 = 1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}, k_2 = 0,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ i } k_3 = 0,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}.$$

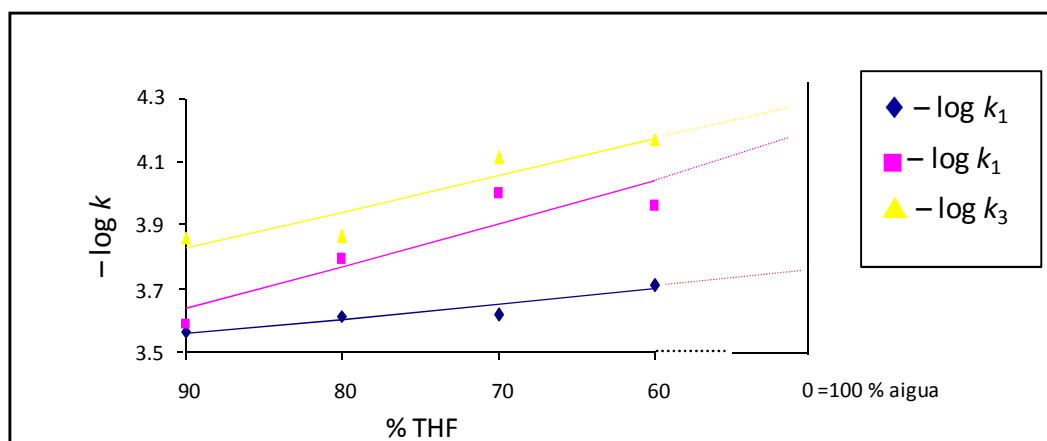


Figura 5.2-4. Representació del logaritmes de les constants en funció del percentatge de tetrahidrofurà en el solvent.

5.2.1.1.2. SEGUIMENT CINÈTIC PER GC-MS

Tal i com ja s'ha comentat en la secció 3.1.3, el seguiment cromatogràfic de la fotodegradació del DecaBDE es va dur a terme enregistrant els TIC (*total ion chromatograms*) a diferents temps de procés.

Cadascun dels TIC enregistrats als diferents temps de procés proporciona un vector. Per tant, és interessant analitzar simultàniament tots aquest vectors construint una matriu \mathbf{D} (vegeu estratègia Figura 5.2-5) per tal d'obtenir informació cinètica i estructural del procés de fotodegradació. Les files d'aquesta matriu \mathbf{D} designen els diferents temps de procés i les columnes els temps d'elució dels TIC. Per tant, en fer un anàlisi MCR-ALS, la matriu \mathbf{C} contindrà els perfils cinètics del procés i la matriu \mathbf{S}^T els TIC 'purs' associats. Cada TIC 'pur' mostra el grup de pics cromatogràfics que té un mateix comportament cinètic.

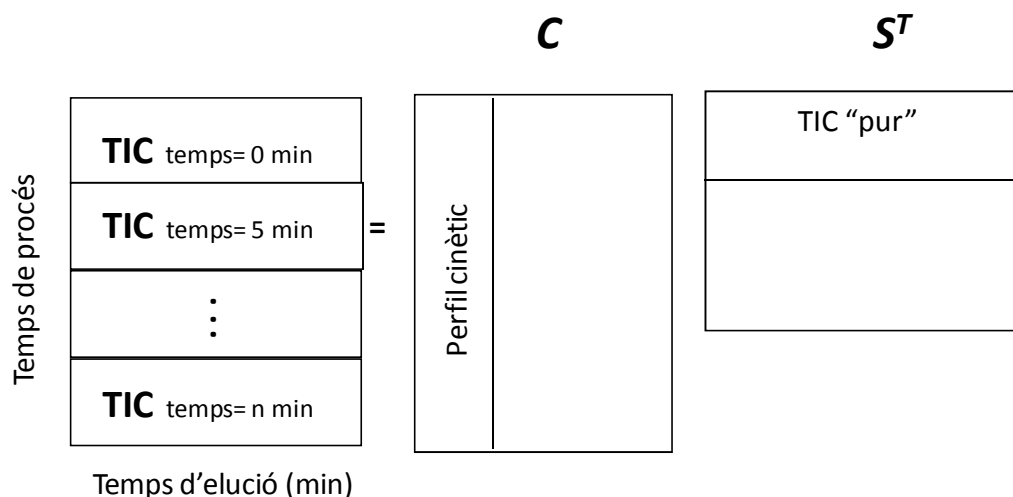


Figura 5.2-5. Estratègia de l'anàlisi simultània dels TIC enregistrats als diferents temps de procés.

A partir de l'anàlisi MCR-ALS dels TIC dels diferents temps de procés es va corroborar que l'evolució del procés de fotodegradació del DecaBDE es podia descriure mitjançant quatre contribucions (vegeu Figura 5.2-6).

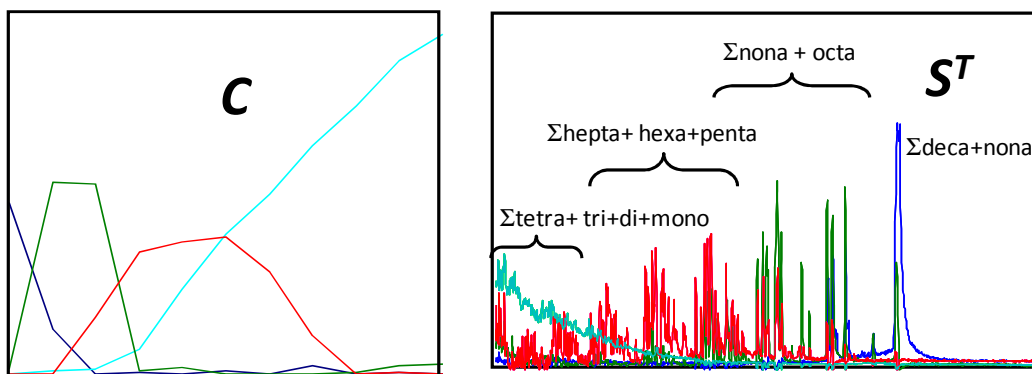


Figura 5.2-6. Resolució de l'anàlisi simultània dels TIC corresponents a diferents temps de procés mitjançant MCR-ALS.

A més, s'observa que cadascun dels perfils cinètics resolts correspon a una mescla de compostos, ja que els TIC 'purs' relacionats contenen molts pics i, per tant, moltes espècies químiques amb comportament cinètic similar. Això indica que els espectres purs resolts en l'experiment per espectroscòpia d'absorció molecular no corresponien a una única espècie química, sinó a una mescla de compostos. Aquest és el cas d'un sistema complex amb un gran nombre de productes, en el qual no es poden modelar totes les espècies mitjançant l'experiment per espectroscòpia ja que aquestes presenten espectres i/o perfils cinètics similars.

Per tal d'intentar caracteritzar els possibles productes de degradació que s'observaven en els TIC 'purs' resolts, es va comparar el temps de retenció d'aquests productes amb el TIC obtingut amb una mescla de diversos PBDE amb diferent nombre de broms. Es va concloure que el TIC 'pur' associat al primer perfil cinètic corresponia al DecaBDE i a nonaBDEs, el segon TIC 'pur' a homòlegs PBDE nona- i octabromats, el tercer TIC 'pur' a hepta-, hexa- i pentaBDEs i el quart TIC 'pur' a tetra-, tri-, di- i monoBDEs. Per tant,

aquest estudi va confirmar que la desbromació fotolítica del decaBDE és una possible via per a la formació de PBDE menys bromats en el medi ambient i per tant adverteix sobre l'ús d'aquest compost.

Com no es disposa d'estàndards de PBDF no es va poder confirmar la presència d'aquests compostos com a productes de fotodegradació per GC-MS.

En resum, a partir dels resultats obtinguts d'aquest treball es pot concloure que:

- El procés de fotodegradació del DecaBDE es un sistema complex en el qual hi ha involucrats un gran nombre de productes. Aquest procés es pot descriure mitjançant un model de tres reaccions consecutives de primer ordre: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$.
- Els resultats de GC-MS indiquen que els components B, C i D corresponen a mescles de congèneres amb menys nombre de broms que el DecaBDE. No obstant això, per la forma dels espectres UV resolt, se suggereix també la possible formació simultània de dibenzofurans polibromats (PBDF) entre els productes de degradació.
- Els valors de les constants aparents successives (k_1 , k_2 i k_3) segueixen una seqüència decreixent en tots els experiments realitzats. Per tant, la velocitat de fotodegradació dels PBDE augmenta amb el grau de bromació
- L'anàlisi simultània de dades multiconjunt procedents d'experiments realitzats en diferents solvents mitjançant HS-MCR ha mostrat que la velocitat de fotodegradació dels PBDE disminueix en augmentar la polaritat del solvent.

- L'aplicació del mètode HS-MCR amb ajust de models cinètics globals ha contribuït a una estimació més acurada de les constants cinètiques i ha permès treballar amb experiments realitzats en condicions lleugerament diferents, ja que l'efecte del solvent sobre els espectres mesurats s'ha modelat com una contribució addicional al senyal, que no ha estat inclosa en els models cinètics ajustats.

5.2.1.2. ESTUDI DE BIOTRANSFORMACIÓ DEL DecaBDE

En aquesta secció es presenta una discussió general dels estudis relacionats amb la biodegradació del producte comercial DecaBDE. Els objectius generals d'aquesta secció són:

- ✓ L'estudi *in vitro* de la biotransformació del DecaBDE mitjançant microsomes de rata.
- ✓ L'ús de diferents tècniques instrumentals (GC-MS i HPLC-MS/MS) per a la determinació dels productes de biotransformació del DecaBDE
- ✓ La proposta d'una metodologia analítica directa HPLC-MS/MS per a la determinació de productes d'hidroxilació del DecaBDE.

Tal i com s'ha comentat en el capítol d'introducció, la biodegradació i la fotodegradació són els processos principals pels quals es produeix una eliminació natural dels contaminants en el medi ambient i, per tant, són de gran importància a l'hora d'avaluar la persistència d'un compost químic.

En l'article 5.2-I s'ha demostrat que el DecaBDE es pot degradar per efecte de la llum produint PBDE amb un menor nombre de broms i altres compostos bromats. Amb la finalitat de tenir un coneixement més ampli sobre el destí ambiental del DecaBDE es va estudiar també la seva biodegradació.

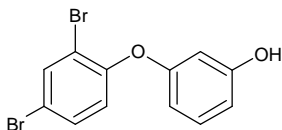
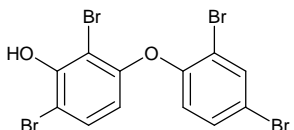
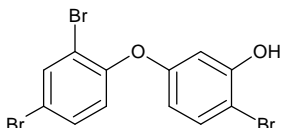
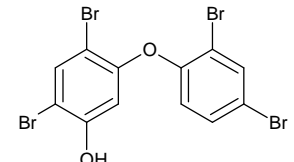
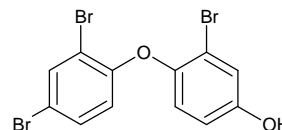
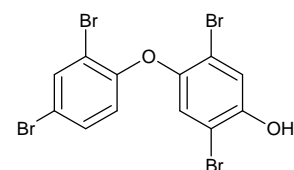
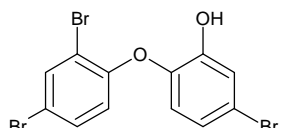
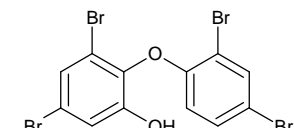
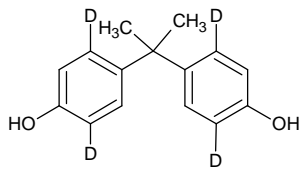
Tal i com s'ha comentat en la secció 2.2.2.1, la majoria dels autors proposen mecanismes de biotransformació dels PBDE basats en la desbromació oxidant (formació de PBDE hidroxilats, OH-BDEs) i en la desbromació reductora (formació de PBDE amb menor nombre de broms). Amb la finalitat d'avaluar la formació de productes menys bromats i de productes hidroxilats durant la metabolització es va utilitzar GC-NCI-MS i HPLC-ISP(–)-MS/MS, respectivament (vegeu secció 3.2).

La metodologia de GC-NCI-MS utilitzada és una lleugera modificació de l'optimitzada en la determinació simultània de 40 PBDE per Eljarrat i col·laboradors [Eljarrat, 2007]. En canvi, la metodologia de HPLC-ISP(–)-MS/MS utilitzada va ser optimitzada en aquesta tesi (vegeu article 5.2-II).

En el moment de realitzar-se aquest estudi en la tesi, els derivats hidroxilats dels PBDE només havien estat determinats per GC-MS, amb una etapa de derivatització dels compostos prèvia a la injecció. Aquesta etapa de derivatització té desavantatges tals com la manipulació de substàncies tòxiques com el diazometà, l'augment del temps d'anàlisi i una quantificació problemàtica perquè la derivatització no sempre té una eficàcia del 100 %. En busca d'una alternativa, en aquesta tesi es va optimitzar un mètode analític basat en HPLC-MS/MS per tal de determinar 8 OH-PBDE (de di- a tetrabromats) en quatre matrius ambientals, que no necessitava derivatització

prèvia dels compostos. En la Taula 5.2-3 es mostren les estructures i les abreviacions dels vuit OH-PBDE analitzats i del patró intern escollit.

Taula 5.2-3. Estructures i abreviacions d'acord amb la nomenclatura IUPAC dels OH-PBDE analitzats

Compost*	Estructura	Compost*	Estructura
3'OH-BDE7 (2)		3OH-BDE47 (6)	
3'OH-BDE28 (3)		5OH-BDE47 (7)	
4'OH-BDE17 (4)		4'OH-BDE49 (8)	
2'OH-BDE28 (5)		6OH-BDE47 (9)	
d ₄ -Bisfenol A (d ₄ -BPA). Patró intern (1)			

* Entre parèntesis es troba l'ordre d'elució dels compostos

La Taula 5.2-4 recull les condicions cromatogràfiques i de l'espectròmetre de MS optimitzades en aquesta nova metodologia analítica.

Taula 5.2-4. Condicions optimitzades per a la metodologia analítica proposada.

Condicions cromatogràfiques				Condicions MS	
Temps (min)	% A	% B	% C	CV (V)	−4000
0,0	50	20	30	T (°C)	400
10	25	20	55	CUR (u. a.)	12
10	25	20	55	NEB (u. a.)	10
				FP (V)	−200
				EP (V)	−10
				CXP (V)	−15

Fase mòbil: A: 5 mM d'acetat d'amoni/B: acetonitril/C: metanol

Cabal: 250 mL/min; Injecció: 5µL

Columna: XBridge C18 (50 mm × 2,1mm de d.i. × 3,5 µm)

CV: Voltatge de capil·lar aplicat en la ionització (ISP). T: Temperatura de desolvatació necessària per a permetre una mínima fragmentació de les molècules abans d'entrar en el primer quadrupol. CUR: gas de cortina, que ve a ser com un filtre del senyal analític. NEB: gas nebulitzador (nitrogen), que ajuda a nebulitzar les molècules s'optimitzen per permetre un senyal constant. FP: potencial per a focalitzar les molècules en el primer quadrupol (Focusing potential). EP: potencial d'entrada al detector del primer quadrupol característic de cada compost. CXP: Potencial de la cel·la de col·lisió. Gas utilitzat: nitrogen

La Figura 5.2-7-a mostra el cromatograma de la mescla dels vuit patrons de OH-PBDE obtingut mitjançant la metodologia proposada. Es pot veure una bona separació per a tots els patrons exceptuant dos tribromats (compostos 3 i 4). No obstant això, aquesta coelució es pot resoldre aprofitant la diferent fragmentació que presenten aquests dos compostos en MS/MS (vegeu Figura 5.2-7-b). Les vies de fragmentació dels OH-PBDE varien d'acord amb la substitució del grup hidroxil en els anells benzènics, d'aquesta manera produeixen transicions característiques del mode de seguiment d'una reacció múltiple (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) que permeten resoldre coelucions de compostos isòmers.

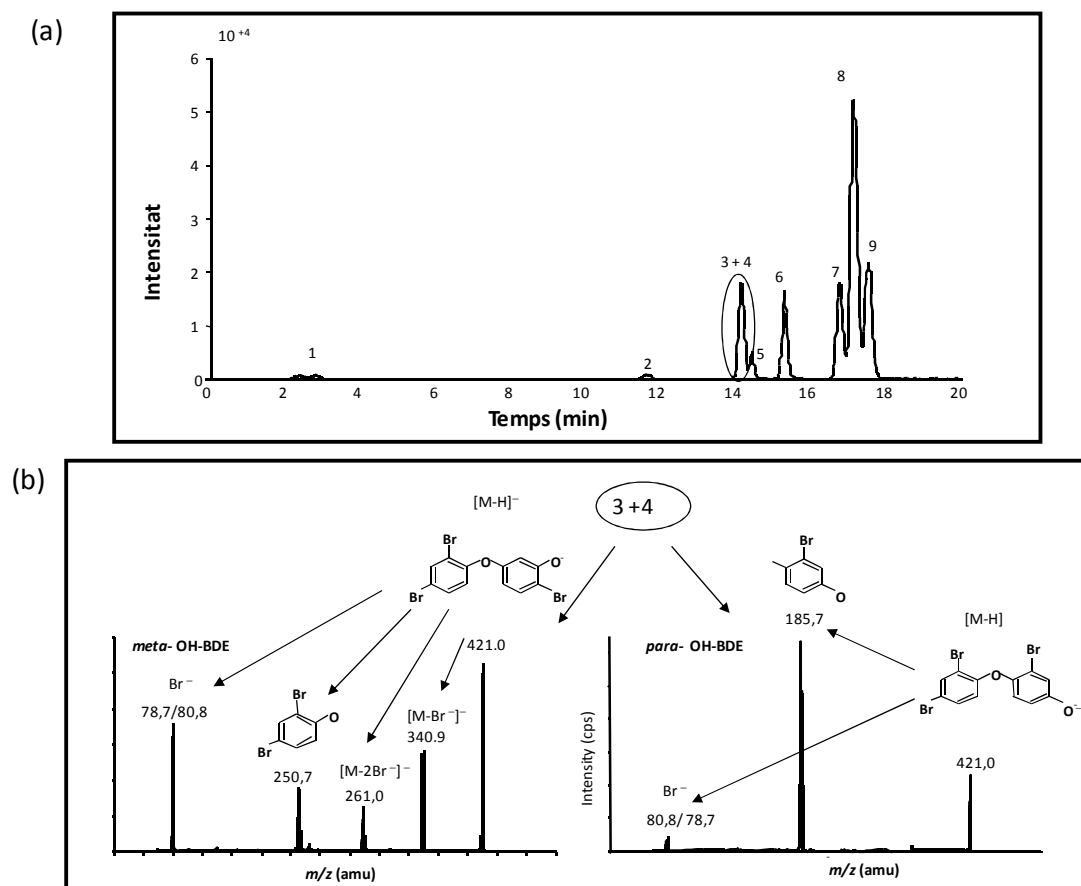


Figura 5.2-7. (a) Cromatograma (TIC) corresponent a la mescla dels 8 patrons de OH-PBDE a $375 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. (b) Espectres de MS/MS del 5-OH-BDE47 (*meta* OH-BDE) i del 6-OH-BDE47 (*orto* OH-BDE).

Els fet que els OH-PBDE analitzats produeixin fragments d'ions específics permet que el QqQ-MS operi en el mode MRM, el qual proporciona una elevada selectivitat i sensibilitat. La Taula 5.2-5 recull les transicions de MRM (ió producte \rightarrow ió fragment) escollides per a cada congènere, els seus valors optimitzats del voltatge de con (Declustering potential, DP), que assegura que es formin ions molecular i no clústers entre les molècules i l'energia de col·lisió (CE) que s'aplica per a poder fragmentar aquest ió producte en ions fragments, que són seleccionats en el segon quadrupol.

Taula 5.2-5. Transicions de MRM, valors de *declustering potential* (DP) i energia de col·lisió (CE) per a cada OH-PBDE.

Compost*	Transició MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)
3'-OH-BDE-7 (2)	342,8→261,0 ⁺	-60	-22
3'-OH-BDE-28 (3)	421,0→340,0 ⁺	-70	-29
	421,0→78,7	-60	-29
4'-OH-BDE-17 (4)	421,0→185,7 ⁺	-60	-37
	421,0→78,7	-60	-29
2'-OH-BDE-28 (5)	421,0→78,7 ⁺	-60	-29
3-OH-BDE-47 (6)	500,8→80,8 ⁺	-60	-70
	500,8→78,7	-35	-40
5-OH-BDE-47 (7)	500,8→80,8 ⁺	-60	-29
	500,8→78,7	-35	-40
4'-OH-BDE-49 (8)	500,8→265,5 ⁺	-60	-45
	500,8→80,8	-60	-70
	500,8→78,7	-35	-40
6-OH-BDE-47 (9)	500,8→80,8	-60	-70
	500,8→78,7 ⁺	-35	-40

* Entre parèntesis es troba l'ordre d'elució dels compostos

Per a fer l'anàlisi quantitativa es va utilitzar la transició de MRM més intensa per a cadascun dels compostos (vegeu ⁺ en la Taula 5.2-5). Aquesta anàlisi quantitativa es va dur a terme mitjançant calibratge amb patró intern i calibratge extern.

Per a avaluar la qualitat de la metodologia proposada, es va estudiar la linealitat, la repetibilitat i la reproductibilitat de la resposta analítica. La linealitat es va estudiar en l'interval de concentracions de 25 a 675 pg μL^{-1} amb set punts en la corba de calibratge. L'estudi de la repetibilitat es va realitzar mitjançant injeccions consecutives ($n = 5$) del patró de 75 pg μL^{-1} en el mateix dia. Finalment, per investigar la reproductibilitat es va fer

mitjançant injeccions del mateix patró en quatre dies diferents. La Taula 5.2-6 recull els valors de límits de quantificació, repetibilitat i reproductibilitat del mètode proposat.

Taula 5.2-6. Valors dels límits de quantificació, repetibilitat i reproductibilitat dels 8 OH-PBDE analitzats per el mètode proposat

Compost*	LOQ (pbb)	Repetibilitat (% RSD, n = 5)		Reproductibilitat (% RSD, n = 4)	
		Ext. Cal.	Int. Cal.	Ext. Cal.	Int. Cal.
3'-OH-BDE-7 (2)	4,6	5	7	23	9
3'-OH-BDE-28 (3)	1,3	6	9	12	10
4'-OH-BDE-17 (4)	0,8	3	4	5	8
2'-OH-BDE-28 (5)	0,9	8	7	9	7
3-OH-BDE-47 (6)	1,1	9	6	27	6
5-OH-BDE-47 (7)	0,8	6	7	5	6
4'-OH-BDE-49 (8)	0,6	6	6	7	6
6-OH-BDE-47 (9)	0,7	4	4	14	8

* Entre parèntesis es troba l'ordre d'elució dels compostos

En la Taula 5.2-6 s'observa que s'obtenen uns bons límits de quantificació i una reproductibilitat i repetibilitat satisfactòries.

Per a validar la metodologia proposada es van analitzar els OH-PBDE en quatre mostres ambientals (sòl agrícola, fang de depuradora, múscul de peix (*Ciprius Carpio*) i matèria particulada). A partir dels valors obtinguts (vegeu Taula 4 de l'article 5.2-II) es va observar que el mètode proposat proporciona uns límits de quantificació acceptables amb nivells de pg g^{-1} de pes per a totes les matrius analitzades.

En resum, a partir de tres punts d'identificació (temps de retenció i dues transicions MRM quan va ser possible) i amb l'optimització de les condicions cromatogràfiques i els paràmetres de MS/MS (Taula 5.2-4) s'ha pogut establir una metodologia analítica que presenta bons límits de quantificació i reproductibilitat i repetibilitat acceptables. Per tant, la metodologia que es proposa en aquesta tesi val la pena considerar-la com una estratègia alternativa per a la determinació directa dels OH-PBDE, sense necessitat de derivatització. Aquesta metodologia s'ha optimitzat amb la finalitat de determinar els productes hidroxilats del procés de biodegradació del DecaBDE que s'ha dut a terme en aquesta tesi.

La biodegradació del DecaBDE es va estudiar mitjançant microsomes de rates enriquits amb CYP2B, CYP1A i CYP4A3. S'han utilitzat aquests microsomes perquè existeix certa evidència que els isoenzims del sistema citocrom P450 CYP2B i, en menor mesura, CYP1A i CYP4A3, estan involucrats en la biotransformació d'alguns congèneres de PBDE [Meerts, 2000].

Les incubacions del DecaBDE amb aquest microsomes enriquits van produir una disminució de la quantitat d'aquest compost, la qual cosa indica que va produir una biotransformació.

El percentatge de recuperació del DecaBDE en els experiments control sense microsomes va permetre confirmar que el procediment experimental i els dissolvents utilitzats eren apropiats. A més, amb aquests controls es va constatar que no hi havia una degradació abiòtica significativa del DecaBDE i que per tant, la disminució observada en la quantitat d'aquest PBDE era deguda a la degradació que té lloc en les incubacions amb microsomes.

Els controls en què no es va addicionar la solució de sistema regenerador de NADPH (NSR) per iniciar el metabolisme es van utilitzar per a comprovar que no hi havia cap transformació en les incubacions que no fos deguda al sistema del citocrom P450.

Per tant, la disminució de la quantitat del DecaBDE que es pot observar en la Figura 1 de l'article 5.2-III és una evidència directa de la biotransformació del DecaBDE pel sistema citocrom P450. A més, s'ha detectat que la incubació del DecaBDE amb microsomes enriquits amb CYP2B presenta una major degradació d'aquest compost que la realitzada amb els microsomes enriquits amb CYP1A i CYP4A3, fet que està amb consonància amb estudis previs sobre la metabolització d'altres PBDE [Meerts, 2000].

L'anàlisi dels extractes microsomals per GC-MS no va permetre detectar productes de desbromació o la formació d'altres productes com els de metoxilació. L'anàlisi dels extractes per HPLC-MS va confirmar l'absència de productes d'hidroxilació.

La no detecció dels bioproductes de degradació per GC-MS o per HPLC-MS podria indicar que els metabòlits formats en la biotransformació es troben units covalentment a macromolècules com proteïnes o lípids, que en dificultarien la identificació, com ja indicaven Mörck i col·laboradors [Mörck, 2003] en un estudi de la biotransformació del DecaBDE en rates. A més, la metodologia de HPLC-MS/MS proposada va ser optimitzada per BDEs hidroxilats de di a tetrabromats, i podria ser que les condicions no s'adeqüessin prou a l'anàlisi de productes d'hidroxilació més pesants, com els que presenten de cinc a nou àtoms de brom en la seva estructura.

En resum, a partir dels resultats obtinguts en els estudis de biodegradació es pot concloure que:

- Hi ha una biotransformació significativa del DecaBDE induïda pel sistema citocrom P450.
- L'absència de pics en els cromatogrames HPLC-MS/MS i GC-MS fan pensar en la necessitat de determinar i identificar els metabòlits de la fase I del DecaBDE tenint en compte la possible interacció amb els components cel·lulars.
- S'ha d'adequar la metodologia de HPLC-MS/MS proposada en l'article 5.2-II als possibles productes d'hidroxilació del DecaBDE més pesants (de penta a nonabromats).

5.2.2. BIBLIOGRAFIA

[Ahn, 2006]

M-Y. Ahn, T. Filley, C. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz. *Photodegradation of Decabromodiphenyl Ether Adsorbed onto Clay Minerals, Metal Oxides, and Sediment*. Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 215.

[Barcellós de Rosa, 2003]

M. Barcellós de Rosa, H-U. Krüger, S. Thomas, C. Zetzsch. *Photolytic debromination and degradation of decabromodiphenyl ether, an exploratory kinetic study in toluene*. Fresen. Environ. Bull. 12 (2003) 940.

[Bezares-Cruz, 2004]

J. Bezares-Cruz, C. Jafvert, I. Hua. *Solar Photodecomposition of Decabromodiphenyl Ether: Products and Quantum Yield*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4149.

[Christiansson, 2009]

A. Christiansson, J. Eriksson, D. Teclechiel, Å. Bergman. *Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether*. Environ. Sci. Pollut. Res. 16 (2009) 312.

[Eljarrat, 2007]

E. Eljarrat, A. Labandeira, G. Marsh, D. Raldúa, D. Barcelo. *Decabrominated ether in river fish and sediment samples collected downstream and industrial park*. Chemosphere 8 (2007) 1278.

[Eriksson, 2004]

J. Eriksson, N. Green, G. Marsh, A. Bergman. *Photochemical Decomposition of 15 Polybrominated Diphenyl Ether Congeners in Methanol/Water*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 3119.

[Hagberg, 2006]

J. Hagberg, H. Olsman, B. van Bavel, M. Engwall, G. Lindström. *Chemical and toxicological characterization of PBDF from photolytic decomposition of decaBDE in toluene*. Environ. Int. 32 (2006) 851.

[Hua, 2003]

I. Hua, N. Kang, C.T. Jafvert, J. Fábrega-Duque. *Heterogeneous photochemical reactions of decabromodiphenyl ether*. Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 798.

[Kajiwara, 2008]

N. Kajiwara, Y. Noma, H. Takigami. *Photolysis Studies of Technical Decabromodiphenyl Ether (DecaBDE) and Ethane (DeBDethane) in Plastics under Natural Sunlight*. Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4404.

[Meerts, 2000]

I.A.T.M. Meerts, J.J. van Zanden, E.A.C. Luijks, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, A. Brouwer. *Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro*. Toxicol. Sci., 56 (2000) 95.

[Mörck, 2003]

A Mörck, H Hakk, U Örn, E Wehler. *Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion*. Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 900.

[Ohta, 2001]

S. Ohta, H. Nishimura, T. Nakao, O. Aozasa, H. Miyata. *Characterization of the photolysis of decabromodiphenyl ether and the levels of PBDE as its photoproducts in atmospheric air of Japan*. Organohalogen Compounds. 52 (2001) 321.

[Palm, 2004]

W.U. Palm, R. Kopetzky, W. Sossinka, W. Ruck, C. Zetzsch. *Photochemical reactions of brominated diphenyl ethers in organic and adsorbed on silicon dioxide in aqueous suspension*. Organohalogen Compounds 66 (2004) 2269.

[Söderström, 2004]

G. Söderström, U. Sellström, C.A. de Wit, M. Tyskind. *Photolytic Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209)*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 127.

[Watanabe, 1997]

I. Watanabe, R. Tatsukawa. *Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant decabromodiphenyl ether in hexane solution by UV and sun light*. B. Environ. Contam. Tox. 39 (1987) 953.

5.3. SEGUIMENT I INTERPRETACIÓ DE PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ DELS BROMOFENOLS

En aquest apartat es mostren els articles que fan referència als estudis de fotodegradació dels bromofenols mitjançant la metodologia experimental i quimiomètrica proposada en la secció 5.1.1.2. En el primer article s'estudia l'efecte del grau de bromació dels bromofenols en el procés de degradació i en el segon article s'investiga l'efecte de la font de radiació utilitzada per a induir el procés.

5.3-I Sílvia Mas, Albert Carbó, Sílvia Lacorte, Anna de Juan, Romà Tauler. *Comprehensive description of the photodegradation of bromophenols using chromatographic monitoring and chemometric tools*. Talanta 83 (2011) 1134.

Aquest article s'orienta a l'estudi de la fotodegradació de sis bromofenols de diferent grau de bromació (des dels monobromofenols fins al pentabromofenol) mitjançant un seguiment cinètic per cromatografia (HPLC-DAD-MS) i l'aplicació del mètode de resolució multivariant de modelització flexible, MCR-ALS. L'objectiu d'aquest treball és oferir una metodologia eficaç per a l'estudi de processos de fotodegradació complexos en els quals es formen un gran nombre de fotoproductes. S'ha obtingut la resolució dels perfils d'elució i espectres purs de les espècies involucrades en el procés de fotodegradació, la qual cosa ha permès obtenir coneixement sobre el mecanisme de fotodegradació, sobre l'estructura química dels fotoproductes principals i l'efecte del grau de bromació en el procés de degradació.

S'ha observat que els processos de fotodegradació dels bromofenols són complexos i donen lloc un nombre elevat de fotoproductes. S'han resolt de

set a nou compostos per als monobromofenols, dotze per al 2,4-dibromofenol, quinze per al 2,4,6-tribromofenol i fins a 34 compostos per al pentabromofenol. S'ha suggerit que aquests processos presenten mecanismes de reaccions paral·leles o de segon ordre i superior. S'ha detectat que la desbromació gradual és la principal via de la fotodegradació dels bromofenols. A més, s'ha identificat també la possible formació de HBr, compostos alifàtics amb brom i bezenones i hidroxibenzens bromats entre els productes de fotodegradació.

5.3-II Anusha Jayaraman ; Sílvia Mas; Romà Tauler; Anna de Juan. *Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques*. Journal of Chromatography B (in press). (DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.03.038).

Aquest article presenta l'estudi de la fotodegradació del 2-bromofenol sota dues fonts de radiació (llum UV i simulador de llum solar) mitjançant tècniques espectroscòpiques i cromatogràfiques. L'estudi d'aquests experiments s'ha dut a terme mitjançant tècniques quimiomètriques de modelització flexible, com ara MCR-ALS i de modelització híbrida rígida i flexible, com el HS-MCR. L'objectiu principal d'aquest treball és elucidar el mecanisme de fotodegradació del procés, la caracterització dels productes de degradació i avaluar l'efecte de les diferents fonts de radiació en el procés de fotodegradació tant des del punt de vista de mecanisme cinètic com de la natura dels fotoproductes formats. En aquest article també es mostren els avantatges i limitacions del dos tipus de seguiment cinètic (espectroscòpic i cromatogràfic). A més, es fa èmfasi en el potencial que té l'anàlisi simultània de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques.

S'ha detectat que la font de radiació afecta la cinètica de degradació però no la identitat dels productes formats. Per a totes dues fonts de radiació, es van identificar deu compostos que segueixen un mecanisme complex de reaccions paral·leles, de segon ordre o superior. A partir dels espectres de MS es va poder postular la identitat d'alguns d'aquests compostos com hidroxibenzens, monobromofenols homòlegs i compostos alifàtics amb brom.



Comprehensive description of the photodegradation of bromophenols using chromatographic monitoring and chemometric tools

Sílvia Mas^{a,b,*}, Albert Carbó^a, Sílvia Lacorte^b, Anna de Juan^a, Romà Tauler^b

^a Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18, Barcelona, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 1 August 2010

Keywords:
Bromophenols
Photodegradation process
Chromatographic monitoring
Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS)
Soft-modeling
Process analysis

ABSTRACT

A general procedure for the study of complex photodegradation processes of environmental pollutants based on chromatographic monitoring and chemometric method is proposed. The procedure consists of multiset data analysis of aliquots collected at different reaction times and injected in High-Performance Liquid Chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry (HPLC–DAD–MS). In this study, photodegradation of six bromophenols with different degrees of bromination has been investigated in order to find out their photodegradation pathways and kinetics and to show the potential of the procedure proposed. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) has been used to resolve chromatographic elution profiles and pure spectra of species involved in the photodegradation process and, hence, to elucidate the photodegradation mechanism and to propose the chemical structure of the main photoproducts. This study shows that chromatographic monitoring is the preferred option when photochemical systems with large number of components with similar spectra and kinetic evolution are analyzed. This work reveals the advantages of the double DAD and MS detection to provide mechanistic and structural information about these complex photodegradation processes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Flame retardants are used to prevent accidental fires by reducing the flammability of combustible materials such as plastics and synthetic polymers. The most important group of flame retardants is the brominated flame retardants (BFRs), which contain a diversity of chemicals such as polybrominated biphenyls (PBBs), tetrabromobisphenol A (TBBPA), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and bromophenols (BP).

Due to the observed increase of these compounds in the environment and in humans and to the proven toxicity of lowly brominated congeners, often banned by environmental policies, concerns about the risk of all BFR compounds have arisen [1]. Assuming that the now in use highly brominated congeners seem to degrade into lowly brominated congeners by the action of light, it is relevant to understand the photodegradation process of BFRs compounds to better understand their environmental fate.

Several studies have proven that BFRs can be degraded by ultraviolet (UV) light and direct sunlight under a variety of conditions

[2–24]. Extensive data exists on the identity of transformation products of, e.g., PBDEs [2–16], TBBPA [17], and rates of degradation have been reported for these compounds [6,8–9,11,12,17].

Bromophenols comprise 19 congeners from mono- to pentabrominated compounds, with physicochemical properties, such as solubility, volatility, and octanol–water partition coefficient (Kow), varying systematically as a function of the degree of bromination and the substitution pattern. The position and number of bromine atoms on the benzene ring may also play a relevant role in the photodegradation rates and mechanism, as it has been observed in the photodegradation studies of their homologs, the chlorophenols [18–20]. Photodegradation of mono-bromophenols has been investigated in previous works, but the studies are mainly focused on the identification of the photodegradation products without entering in depth into the degradation pathways involved [20–26]. The scarcity of works about polybrominated compounds is even larger and to the knowledge of the authors, no detailed mechanistic photochemical works have been conducted on these highly brominated compounds. Obtaining this information and providing the necessary methodology for this purpose and, in general, for monitoring and interpretation of complex photodegradation processes is the main goal of the present work.

We have recently studied the photodegradation processes of decabromodiphenyl ether (a PBDE compound) [27] and of nitro-

* Corresponding author at: Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 403 44 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: silviamas@ub.edu (S. Mas).

furazone (a well-known antibacterial agent) [28] under UV light by classical UV–visible (UV–vis)-spectrophotometric monitoring, i.e., collecting spectra from the solution of the compound of interest as a function of time, followed by the application of chemometric tools. For this kind of experiments, the hybrid hard- and soft-modeling multivariate curve resolution-alternating least squares (HS-MCR) [29] provided an efficient methodology for the comprehensive study of this kind of processes, helping in the interpretation of the degradation steps. HS-MCR provided kinetic profiles and pure spectra of the photodegradation products and the rate constants of the process. However, in both studies, the presence of identical (or very similar) kinetic and spectra profiles among the species involved in the photodegradation process made that the components resolved by HS-MCR had to be interpreted as mixtures of congeners (or compounds of similar behavior) rather than as single specific chemical compounds. Preliminary soft-modeling MCR [30–33] resolution results on few chromatographic data (model-free experiments) for the same systems confirmed the complexity of the degradation processes, since the number of compounds modeled from the chromatographic runs was higher than the number of species resolved in the classical spectroscopic experiments. Indeed, the different elution behavior of these compounds is the reason why they can be individually modeled, even though they may present an identical kinetic evolution or very similar spectra. Therefore, analysis of chromatographic data is the preferred option when photodegradation processes from systems with large number of compounds or with compounds with similar spectra and kinetic evolution must be analyzed, as it has also been seen in previous works [34–36].

In the present work, the photodegradation of six bromophenol congeners with different degrees of bromination has been investigated. Assuming the complexity of the photodegradation processes, instead of using the classical spectroscopic monitoring, where reactions are followed by spectroscopic method and interpreted by HS-MCR, the photodegradation processes have been monitored by high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and to mass spectrometry (HPLC–DAD–MS) and interpreted by multiset analysis by MCR-ALS. Aliquots collected at different reaction times have been injected and analyzed simultaneously in order to resolve chromatographic elution profiles and pure spectra of the photodegradation products, to propose the chemical structure of the main photoproducts and to elucidate the mechanism of the degradation process. The double DAD and MS detection provides clear advantages. On one hand, the high signal/noise ration in DAD detection is better at discriminating all eluted compounds among them and, hence, to provide a global picture of their kinetic evolution. On the other hand, MS detection provides resolved MS spectra with easily interpretable features useful for compound identification.

2. Experimental

2.1. Chemicals

2-Bromophenol (2BP), 3-bromophenol (3BP), 4-bromophenol (4BP), 2,4-dibromophenol (24DBP), 2,4,6-tribromophenol (246TBP) and 2,3,4,5,6-pentabromophenol (PBP) (98–99% purity) were purchased from Sigma–Aldrich Corp. (St. Louis, MO USA) and used without further purification.

Ammonium acetate and acetic acid (analytical grade) and acetonitrile and methanol (HPLC-grade) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Finally, MilliQ water, with a conductivity $<0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$, was obtained using a MilliQ water purification system (Millipore, Mosheim, France).

2.2. Apparatus and experimental setup

2.2.1. Photodegradation setup

The photodegradation of bromophenols was carried out in a cylindrical annular batch reactor equipped with a UV lamp. The reactor consisted of an immersion quartz tube (2.5 cm i.d., and 38 cm in length), which held a low-pressure mercury vapor lamp (LPML) of 15 W (Heraeus Noblelight, Germany). The light source emitted predominantly at 254 nm. The quartz tube was placed in a Pyrex glass outer reactor (with a capacity of 0.7 l).

2.2.2. Chromatographic setup

Chromatographic equipment consisted of a Waters 2690 series Alliance HPLC (Waters, Milford, MA), with a quaternary pump equipped with a 120 vial capacity sample management system. The liquid chromatograph was coupled to a Waters 9960 diode-array (DAD) and mass spectrometer (MS) detection systems in tandem.

The analytes were separated on a 250 mm \times 4 mm, I.D. $5 \mu\text{m}$ C₁₈ reversed phase column LiChrospher 100 RP-18 column (Merck). The sample injection volume was set at 30 μL . A ternary isocratic mobile phase with 55% methanol/acetonitrile (25:75) and 45% acetic acid/acetate buffer pH 3.5 (B) was used at a flow rate of 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. An Orion 510 pH-meter was used to verify the suitable pH of the mobile phase.

Within the DAD–MS detection system, MS detection was carried out on a benchtop triple quadrupole mass spectrometer Quattro LC from Micromass (Manchester, UK) with APCI (atmospheric pressure chemical ionization) interface at the following conditions: capillary voltage -3.0 kV , cone voltage -30 V , source and desolvation temperatures 150 and 500 $^{\circ}\text{C}$, respectively, nitrogen (99.999% purity) flow 48 L/h for the cone gas and 325 L/h for desolvation gas. The MS detector was operated in scan mode (70–600 amu) with scan duration of 1 s/scan and an interscan time of 0.1 s. The DAD detection in the UV–vis range was operated at spectral resolution of 1.2 nm in the spectral range from 200 to 500 nm and collecting one spectrum per second.

2.3. Experimental procedure

The bromophenol solutions were prepared in mobile phase at a concentration of ca. $7 \times 10^{-4} \text{ M}$. The samples were placed in the photoreactor and were irradiated by the low-pressure mercury vapor lamp at room temperature. At different time intervals selected during the photodegradation process, aliquots of 1 mL of the sample were collected and analyzed by HPLC–DAD–MS. Table 1 shows the different process times at which aliquots from bromophenol solution were collected for later injection. Time intervals were selected based on simple auxiliary studies done only with classical spectroscopic monitoring on the same kind of compounds, where it was seen a faster spectroscopic evolution at the beginning of the process. This is the reason why the time intervals among the first aliquots collected are smaller than the ones at the end.

3. Data analysis

3.1. Data acquisition

Masslynx (version 3.5) was the software supplied with the mass spectrometer of Micromass (Manchester, UK) for control, data acquisition and data preprocessing. DataBridge was a file converter provided with Masslynx to convert LC–DAD–MS raw files into an ASCII format. Matlab[®] for Windows (version 7.0) was used for data preprocessing, programming, calculations and graphical representation. An in-house written Matlab routine was employed to convert the ASCII format into Matlab readable files. Following this procedure, the data obtained from each LC–DAD–MS raw file were

Table 1
Process times at which aliquots from each bromophenol solution were collected for later injection in HPLC–DAD–MS.

Aliquot number	Process time (min)					
	2BP	3BP	4BP	24DBP	24GTBP	PBP
1	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	2	1
3	2	2	2	3	5	5
4	3	4	3	5	8	8
5	4	5	4	7	10	10
6	5	7	10	10	15	15
7	10	10	15	21	24	20
8	15	15	20	30	32	30
9	20	20	30	40	40	40
10	45	30	40	50	70	65
11	54	40	50	65	90	91
12	63	50	60	105	120	120
13	90	65	80	145	136	160
14	102	81	100	180	152	200
15	120	100	120	225	227	230
16	168	122	150	295	302	320
17	180	150	180	364	360	386
18	210	189	210	433	390	416
19	238	210	240	480	421	446
20	300	240	300			
21	390	324	360			
22		360	390			
23		420				

finally organized into two data matrices: one for the chromatogram with DAD detection and another one for the chromatogram with MS detection.

3.2. Data structure

Each chromatographic run coming from an aliquot of a particular k process time provided two data matrices: one for DAD detection, $D_{k(DAD)}$ and another one for MS detection, $D_{k(MS)}$, which can be described by the bilinear model in Eq. (1).

$$D_{k(DAD \text{ or } MS)} = C_{k(DAD \text{ or } MS)} S^T_{k(DAD \text{ or } MS)} + E_{k(DAD \text{ or } MS)} \quad (1)$$

Rows of matrices $D_{k(DAD)}$ and $D_{k(MS)}$ are the UV–vis or MS spectra recorded at different elution times, and columns of matrices $D_{k(DAD)}$ and $D_{k(MS)}$ are the chromatographic elution profiles recorded at different wavelengths and at different m/z , respectively. $C_{k(DAD)}$ and $C_{k(MS)}$ are the matrices of the elution profiles of the resolved pure compounds during a particular chromatographic run in the analysis of aliquot (process time) k by means of DAD and MS detection, respectively. $S^T_{k(DAD)}$ and $S^T_{k(MS)}$ are the matrices of the related resolved pure spectra. Finally, $E_{k(DAD)}$ and $E_{k(MS)}$ are the noise contributions not included in the bilinear model (see Fig. 1a).

The same bilinear model holds for the multiset structures formed by all the chromatographic runs coming from the aliquots collected at the different N times of the photodegradation process

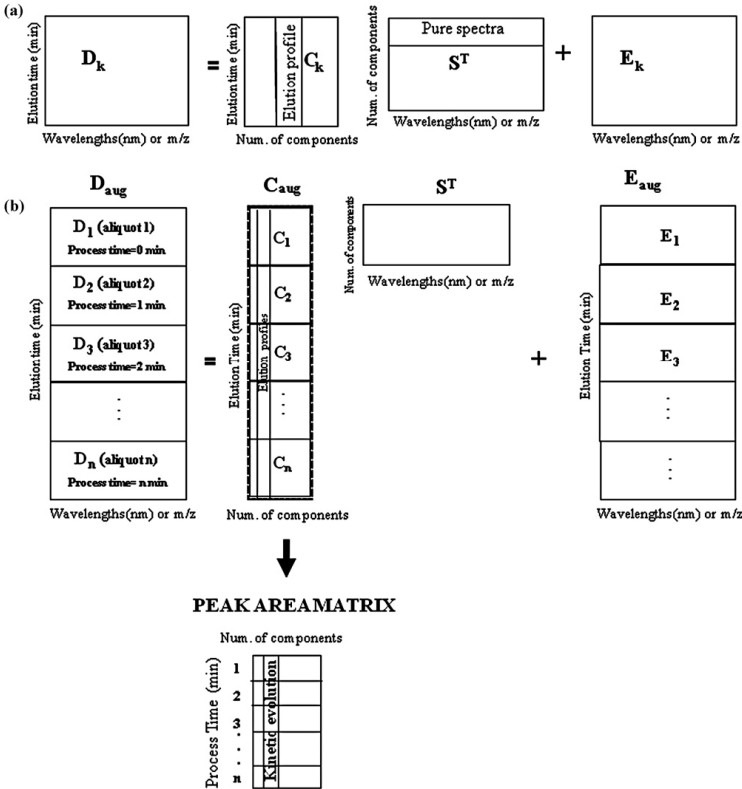


Fig. 1. (a) Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) applied to the single data matrix $D_{k(DAD \text{ or } MS)}$ and (b) MCR-ALS applied to the column-wise augmented data matrix $D_{aug(DAD \text{ or } MS)}$. D_1 , D_2 , D_3 and D_n are the aliquots collected at the different process times.

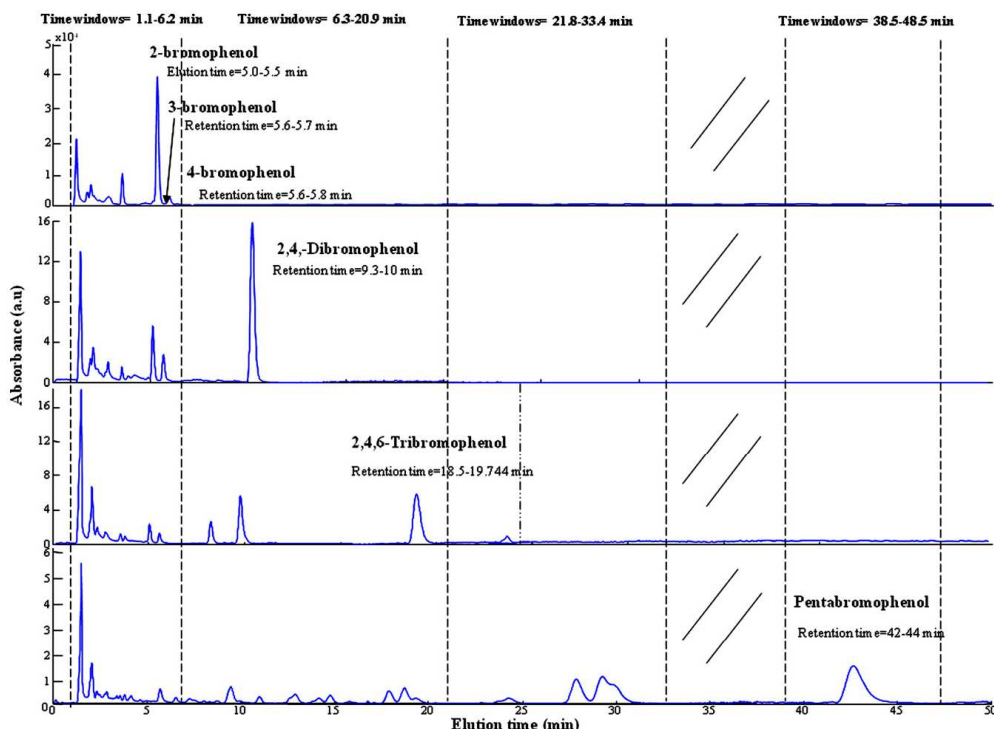


Fig. 2. Time window design applied to the chromatograms of monobromophenols, 2,4-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol and pentabromophenol. The picture shows the mean chromatograms of these compounds at an intermediate process time. The retention time of the parental compound is identified. Dashed lines delimit time window boundaries.

($k=1, 2, \dots, N$). These multiset structures are organized by setting the data matrices $\mathbf{D}_k(\text{DAD or MS})$ one on top of each other (column data matrix augmentation). The new column-wise augmented data matrix $\mathbf{D}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS})$ (see Fig. 1b) obeys now the extended bilinear model equation.

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS}) &= [\mathbf{D}_1(\text{DAD or MS}); \mathbf{D}_2(\text{DAD or MS}); \dots; \mathbf{D}_N(\text{DAD or MS})] \\ &= [\mathbf{C}_1(\text{DAD or MS}); \mathbf{C}_2(\text{DAD or MS}); \dots; \mathbf{C}_N(\text{DAD or MS})] \\ &\quad \mathbf{S}_{(\text{DAD or MS})}^T + [\mathbf{E}_1(\text{DAD or MS}); \mathbf{E}_2(\text{DAD or MS}); \dots; \\ &\quad \mathbf{E}_N(\text{DAD or MS})] = \mathbf{C}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS}) \mathbf{S}_{(\text{DAD or MS})}^T \\ &\quad + \mathbf{E}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS}) \end{aligned} \quad (2)$$

where $\mathbf{C}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS})$ is a column-wise augmented matrix formed by the $\mathbf{C}_k(\text{DAD or MS})$ submatrices that contain the resolved elution profiles in the different chromatographic runs, and $\mathbf{S}_{(\text{DAD or MS})}^T$ is (as in Eq. (1)), the single matrix of pure spectra of the resolved compounds, common to all chromatograms analyzed. $\mathbf{E}_{\text{aug}}(\text{DAD or MS})$ contains the noise not included in the bilinear model.

From the bilinear model of several chromatographic runs related to the aliquots collected at different times of the photodegradation process, kinetic profiles of the compounds involved in the photodegradation process can also be derived by displaying the evolution of the areas of the resolved peaks as a function of the process time (see Fig. 1b).

3.3. Data pretreatment

Before recovering the bilinear model expressed in Eq. (2) from the raw data by multivariate curve resolution (see Section 3.4), some data pretreatments were applied to solve problems related to the data matrix size and to the large number of compounds to be resolved.

Photodegradation experiments monitored by series of chromatograms that present many chromatographic peaks hinder the complete resolution of the data set, particularly when the pure spectra of the different compounds are similar among them. In order to facilitate a good differentiation among the compounds involved in the photodegradation process, elution time-windowing [37,38] was carried out taking into account the number of compounds of the chromatograms and the elution windows of families of compounds of interest. Fig. 2 shows the boundaries of the time windows set for the different bromophenols studied, taking as a reference for visualization the mean chromatogram of one of the aliquots injected during the degradation process. Looking at the retention times of the parental bromophenols, it can be seen that time windows often separate compounds with different degrees of bromination. In all cases, time windows were easy to set because clear peak clusters could be distinguished in the chromatographic runs.

Once the time windows for each photodegradation process were set, one or several multiset structures built with analogous time windows from the different chromatographic runs were

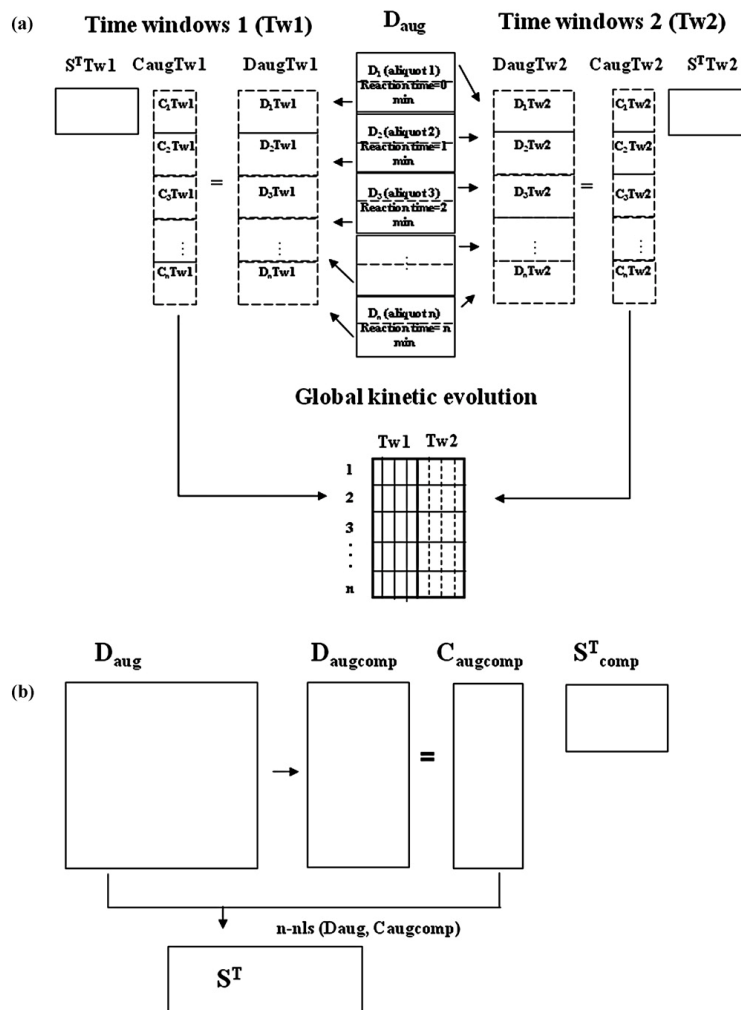


Fig. 3. (a) Time windowing strategy applied to the resolution column-wise augmented data matrix $D_{aug}(DAD \text{ or } MS)$. $C_{i,Tw1}$ and S^T_{Tw1} refer to resolved elution profiles and pure spectra of each time window multiset structure, respectively. Global kinetic evolution is obtained by appending peak areas of resolved compounds from both time window multiset structures (b) MCR-ALS applied to compressed data matrix $D_{augcomp}(MS)$ and non-negative least squares (n-nls) recuperation of the full resolved spectra.

analyzed independently. The global interpretation of the kinetic evolution of compounds involved in the photodegradation process can be obtained by considering altogether the results of all multiset structures derived from the same photodegradation process (see Fig. 3a).

Due to the relative large size of MS spectra (580 m/z values for each individual MS spectrum), compression of $D_{aug}(MS)$ in the spectral direction was done by suppressing m/z channels with irrelevant information. The mean mass spectrum of $D_{aug}(MS)$ was taken as the reference to perform the elimination of irrelevant m/z channels and the m/z channels showing less than 1% of intensity with respect to the maximum were removed. Such a procedure provided a compression from 580 to 90–180 m/z channels in each MS spectrum. A new compressed data matrix $D_{augcomp}(MS)$ keeping the relevant

chemical information present in the original data matrix $D_{aug}(MS)$ was obtained. The new compressed data matrix $D_{augcomp}(MS)$, obeys also the bilinear model:

$$D_{augcomp}(MS) = C_{augcomp}(MS) S^T_{comp}(MS) + E_{aug}(MS) \quad (3)$$

where the rows of matrix $D_{augcomp}(MS)$ are the compressed MS spectra. $C_{augcomp}(MS)$ is the column-wise augmented matrix of the resolved chromatographic elution profiles, which is the final result sought since relevant information is kept in the compressed original matrix $D_{augcomp}(MS)$, and $S^T_{comp}(MS)$ is the matrix of their corresponding pure compressed MS spectra (see Fig. 3b). To recover the matrix of full resolved spectra, a single non-negative least squares step is

Table 2
Number of resolved components and variance explained by MCR-ALS analysis of the photodegradation experiments of the investigated bromophenols.

Bromophenols	DAD		MS	
	N. of components	r^2	N. of components	r^2
2BP	9	98.6	6	70.4
3BP	7	96.5	6	72.6
4BP	7	97.8	6	79.8
24DBP				
1.1–6.2 min	10	96.1	6 ^a (8)	57.9 ^b (95.8)
6.3–12 min	2	99.9	1	94.1
246TBP				
1.1–6.2 min	9	97.5	7 ^a (9)	53.3 ^b (96.7)
6.3–22.0 min	6	99.9	4 ^a (5)	75.6 ^b (98.8)
PBP				
1.1–6.2 min	11	96.7	7 ^a (9)	64.5 ^b (98.7)
6.3–20.9 min	15	97.7	7 ^a (8)	69.8 ^b (90.8)
21.8–33.4 min	6	97.8	4 ^a (3)	66.2 ^b (95.8)
38.5–48.5 min	2	99.9	1	92.2

^a Number of chemical compounds without the contribution of the background (in parenthesis, total number of components in the analysis: chemical compounds + background contribution).

^b Explained variance by all chemical compounds without the contribution of the background (in parenthesis, explained variance by all components: chemical compounds + background contributions).

performed by doing:

$$\mathbf{S}^T = \mathbf{C}_{\text{augcomp}}(\text{MS})^+ \mathbf{D}_{\text{aug}}(\text{MS}) \quad (4)$$

where $\mathbf{C}_{\text{augcomp}}(\text{MS})^+$ is the pseudoinverse of $\mathbf{C}_{\text{augcomp}}(\text{MS})$ and $\mathbf{D}_{\text{aug}}(\text{MS})$ is the original uncompressed MS matrix.

3.4. Data treatment

Multivariate curve resolution (MCR) aims at resolving the bilinear model $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T$ (shown in Eqs. (2) and (3)) by using the sole information contained in the raw data set \mathbf{D} [30–33]. For this purpose, an alternating least squares (ALS) algorithm is used to refine iteratively the \mathbf{C} and \mathbf{S}^T matrices so that an optimal reproduction of the experimental matrix \mathbf{D} is achieved. At each iterative cycle of the optimization, matrices \mathbf{C} and \mathbf{S}^T are calculated under constraints trying to minimize the reproduction error, $\|\mathbf{D} - \mathbf{C}\mathbf{S}^T\|$. The percentage of explained variance is calculated according to the expression:

$$r^2(\%) = 100 \times \frac{\sum_{ij} d_{ij}^{2*}}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \quad (5)$$

where d_{ij}^* are the values of the data set reproduced by the bilinear model and d_{ij} the original values in the raw data set \mathbf{D} .

The detailed steps of the algorithm have been described elsewhere [30–33,36,39].

In the context of the photodegradation experiments, different constraints are applied to give chemical meaning to the solutions obtained by MCR-ALS [30]. The constraints selected for the chromatographic data from the photodegradation experiments were: non-negativity (both elution profiles and pure spectra of the resolved components must be positive), normalized pure spectra and unimodality (presence of only one maximum per profile). The unimodality constraint is applied independently to each concentration submatrix in multiset structures. In our example, unimodality was applied in the DAD multiset structures to all the elution profiles in submatrices of \mathbf{C}_{aug} , i.e., to all resolved components in the analysis of DAD data, since all elution profiles are related to a distinct pure spectrum. However, in the analysis of MS data, unimodality was not applied to all the resolved components, since compounds with identical pure MS spectra, e.g., homolog compounds, show a single pure spectrum and a related elution profile with several peaks, one per each of the retention times of the homologs within

the same class. A relevant constraint in evolving systems, such as chromatographic elutions, is the use of selectivity and local rank information (some components are forced to be absent in some elution ranges). Strict selectivity, understood as the presence of a single compound in a certain elution range, was only applied at the aliquot related to process time = 0, where only the parent compound is allowed to be present. In multiset structures, the local rank information has been set taking advantage of the fact that elution patterns among chromatographic runs should be comparable since all injections were done in the same conditions. Elution windows are very clear in aliquots where the compounds are major. Therefore, in some few aliquots, and only when some compounds are really minor, it has been prevented that these minor compounds appear in an elution range very far from the one found in the runs where these compounds are dominant. In these cases, for a particular compound, a zero-component window in further elution ranges has been set as a constraint.

In the case of the compressed data matrix $\mathbf{D}_{\text{augcomp}}(\text{MS})$, once $\mathbf{C}_{\text{augcomp}}(\text{MS})$ has been estimated by ALS, application of one additional non-negative least squares step to the original non-compressed data matrix $\mathbf{D}_{\text{augcomp}}(\text{MS})$ allowed the recovery of the full non-compressed MS spectra of bromophenols and photoproducts ($\mathbf{S}^T_{\text{comp}}(\text{MS})$), to facilitate the identification of these compounds.

Finally, the kinetic profiles of the compounds involved in the photodegradation process have been derived displaying the evolution of the areas of the resolved peaks in each chromatographic run of the multiset structures as a function of the process time in which the injected aliquots were collected (see Fig. 3a).

4. Results and discussion

As a general summary, Table 2 lists the number of resolved components and the explained variance obtained from the MCR-ALS analyses of the photodegradation experiments of each bromophenol congener. This table comprises the results achieved from both DAD and MS data resolutions with the related time windows, when necessary.

The high number of components modeled (7–9 for monobromophenols, 12 for the dibromophenol, 15 for the tribromophenol and 34 for pentabromophenol for DAD data) confirms the complexity of the photodegradation process, which prevents the complete modeling of all compounds in the bromophenol photodegradations

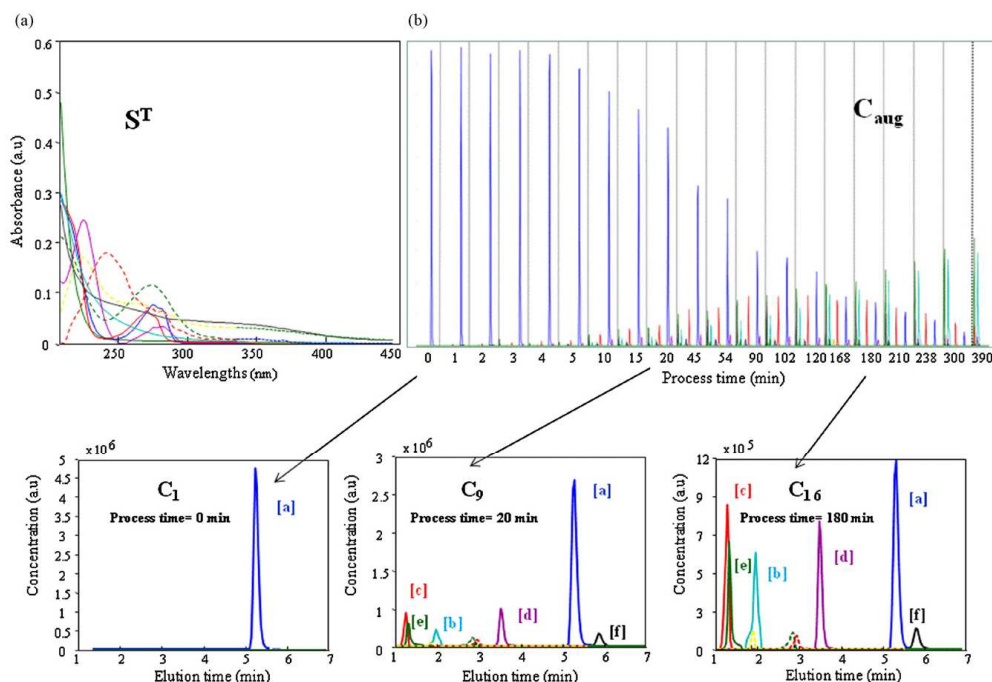


Fig. 4. Simultaneous MCR-ALS analysis of 21 chromatographic runs related to the photodegradation experiment of 2-bromophenol. (a) Pure resolved spectra (matrix S^T) and (b) pure elution profiles related to submatrices of C_{aug} . Bottom plots correspond to zoomed elution profiles related to the extracts collected at process time 0, 20 and 180 min.

by classical UV–vis spectroscopic monitoring, e.g., with spectra collected as a function of time, as could be observed in previous works [27,28]. The complexity of these systems also justifies the different time windows selected to achieve a complete resolution of the data, shown in Table 2. In some analyses, an additional background contribution was needed (particularly in MS data of highly brominated compounds) to improve the resolution results.

Another trend in Table 2 is the lower variance explained and the lower number of resolved components obtained from the analyses of MS data when compared with the DAD results. This can be attributed to two different reasons: the high noise level of MS chromatograms that turned into a lower explained variance and made infeasible the detection of some minor components and the fact that homolog compounds present identical pure MS spectra and, therefore, are identified as a single component with a single spectrum and a multimodal peak. Hence, in many instances, the pure spectra obtained from MS data resolution should be attributed to mixtures of compounds rather than to a single specific species. Furthermore, some arbitrary run-to-run variations of MS intensity data were encountered, which hindered deriving kinetic profiles from the evolution of the peak area of the resolved compounds as a function of process time. And, therefore, the use of the MS results was preferred to be only restricted in the identification of photoproducts. All these differences among DAD and MS results have prevented the simultaneous analysis of DAD and MS fused data, performed in previous works [40]. Thus, DAD results have been considered to offer a good picture of the kinetic evolution of the process because the higher capability of differentiation among single species (particularly, homologs and minor compounds), whereas MS results have been specifically focused on the identification of

photoproducts because of the easy interpretation and rich structural information of MS features.

4.1. Photodegradation of monobromophenols

To illustrate the kind of results obtained, analyses of DAD and MS data from the photodegradation experiment of 2-bromophenol will be explained in detail. Twenty-one extracts from light incubations at different process times (from 0 to 390 min) were selected in order to achieve a complete description of the photochemical degradation process.

Fig. 4a and b shows the resolved augmented concentration profiles (C_{aug}) and the related UV–vis pure spectra (S^T) for 2-bromophenol degradation, respectively. Resolution of nine species was achieved with a satisfactory explained variance ($r^2 = 98.6\%$). The inclusion of a different number of species gave lower explained variance or unreliable spectra.

As can be seen, C_{aug} (Fig. 4b) contains the resolved elution profiles of 21 chromatographic runs corresponding to the extracts collected at the different process times from 0 to 390 min. Fig. 4 also shows zoomed resolved submatrices of C_{aug} related to the extracts collected at 0, 20 and 180 process time. The zoomed figures allow seeing the MCR-ALS power to resolve very overlapped and minor species. Moreover, it is also remarkable that some of the photoproducts investigated in this work had very similar UV–vis-spectra and, hence, the differences in the elution behavior were crucial to facilitate the distinction of the species involved in the photodegradation process.

Fig. 5 shows the plot of the evolution of the area of the resolved peaks (derived from C_{aug} , see Fig. 1b and data treatment section)

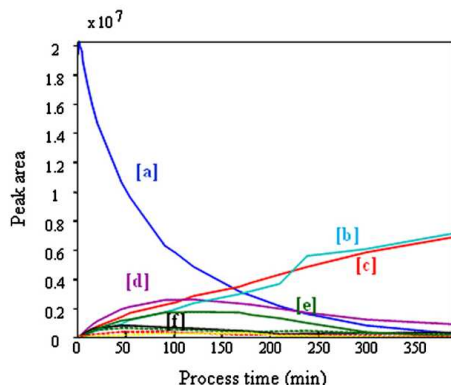


Fig. 5. Evolution of the area of the resolved peaks as a function of process time in the 2-bromophenol photodegradation experiment.

as a function of process time. From this plot, it can be observed the presence of intermediates (labelled [d], [e] and [f]) and end products of photodegradation (labelled [b] and [c]). Similar kinetic evolutions among these products ([d], [e] and [f] and [b] and [c]) are also observed. From the shape of these kinetic profiles, a reaction mechanism based on a sequence of parallel or second- or higher-order reactions is clearly more suitable than a kinetic model based on first-order consecutive reactions.

Once seen the large similarity among the shape of the resolved pure spectra and the similar shape of many kinetic profiles, it is more understandable why the classical UV–vis spectroscopic mon-

itoring would not be adequate for a comprehensive description of the bromophenol photodegradation process (rank-deficiency phenomena would surely be encountered) [41,42]. These phenomena would have translated in chemical terms into the impossibility to distinguish among certain compounds based on their spectral shapes and would have probably mistaken the now more clear complex reaction mechanism (parallel or high-order reaction scheme) for a series of first-order consecutive reactions.

As mentioned before, while the analysis of DAD data allows the resolution of very minor species, homolog species and, hence, provides a global picture of the kinetic evolution of the process, analysis of MS data is needed for the identification of photodegradation products because of the interpretative power of interpretation of MS features.

Fig. 6 shows the MS pure spectra obtained from the resolution of the multiset MS chromatographic data set and their correspondence with the photodegradation products resolved from DAD data (Fig. 5). As stated before, a lower number of resolved components in the analysis of MS data were obtained since, in this case, very minor compounds were not detected with our MS detection system and congeners appear often as single compounds with a multimodal elution profile. For identification, it should be taken into account that the deprotonated molecular ion ($M-H$)⁻ of the parental compound and the photodegradation products were obtained due to the fact that ionization source (APCI) was used in negative mode. Based on the molecular weight obtained and on the retention times available for parental compounds, the chemical structures in Fig. 5 were proposed. As it can be seen, the bromine atom of 2-bromophenol (structure [a]) under light irradiation was transferred from the 2-position to the 4-position (structure [f], see retention time of 4-bromophenol), which is in agreement with the result reported by Akai et al. [21]. The typical isotope ratio of [Br⁻] and the molecular weight obtained from the MS spectra [c] and [e] suggest

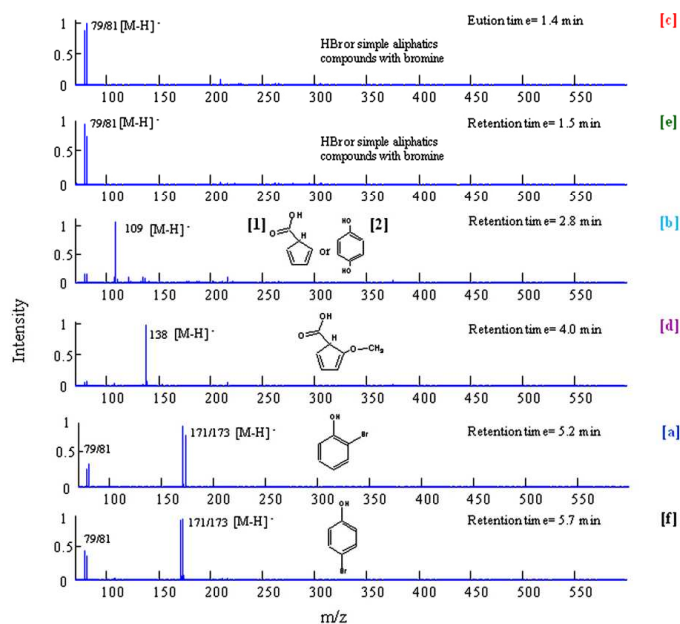


Fig. 6. MS pure spectra and related proposed chemical structures achieved from the MCR-ALS analysis of LC-MS runs obtained during the 2-bromophenol degradation. Compound labels are as in Fig. 5.

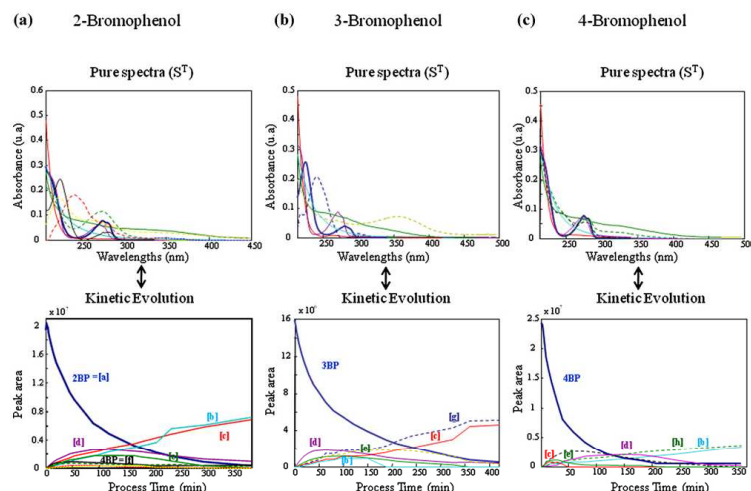


Fig. 7. Evolution of the area of the resolved peaks as a function of process time and related resolved pure spectra (S^T) for the degradation of (a) 2-bromophenol, (b) 3-bromophenol and (c) 4-bromophenol. Compound labels are as in Figs. 5 and 6.

the formation of HBr and simple aliphatic compounds with bromine among the breakdown products, which is in agreement with the results obtained by Joscheck et al. [22] and Lipcynskakochany et al. [26]. Moreover, in conformity with these previous works, dihydroxybenzene (structure [b1]) could also be a photodegradation product. Finally, as reported in the photodegradation studies of their homologs, the chlorophenols [19], cyclopentadienic acid (structure [b2]) and methoxy cyclopentadienic acid (structure [d]) have also been suggested.

Fig. 7a–c shows the evolution of peak areas of the resolved compounds as a function of process time and their related UV–vis pure spectra (S^T) for 2-bromophenol, 3-bromophenol and 4-bromophenol, respectively. Thick lines correspond to parental compounds, solid lines are related to common species to all degradation processes and dashed lines are attributed to specific species for each particular bromophenol. Two intermediates, methoxy cyclopentadienic acid ([d]) and HBr or simple aliphatic compounds with bromine ([e]) were common in the three photodegradation experiments. The end products, dihydroxybenzene ([b1]) or cyclopentadienic acid ([b2]) and HBr or simple aliphatic compounds with bromine ([c]) were also common in 2BP and 4BP and 2BP and 3BP photodegradation experiments, respectively. However, the end products [b] and [c] of 2BP photodegradation experiment acted as intermediates in 4BP and 3BP photodegradation experiments, respectively. From the UV–vis pure spectra and the retention times encountered, it is important to note that only the ortho-position of bromine in 2BP tends to promote isomerization process, confirming again the structure of 4BP ([f]) in Fig. 6. Finally, [g] and [h] are unidentified photoproducts of 3BP and 4BP, respectively.

4.2. Photodegradation process of bromophenols with higher degree of bromination

This section describes the results of the analyses of the photodegradation experiments of bromophenols with higher degree of bromination. Once known the methodology needed to obtain the relevant information for photodegradation processes (explained in detail for 2-bromophenol) the presented results will focus on the

evolution of the area of the resolved peaks as a function of process time, which provides the kinetic information, and on the identification of the modeled species by MS (the elution profiles and related pure spectra from the resolution results of the multiset chromatographic structures for highly brominated compounds are available on request).

Fig. 8 shows the kinetic evolution of the parental compound and photoproducts for 2,4-dibromophenol (8a), 2,4,6-tribromophenol (8b) and pentabromophenol (8c) degradation processes. The sub-plots in 8a, b and c refer to the different time windows analyzed (see Fig. 2) for a better visualization.

In Fig. 8, the groups of resolved species that seem to have a similar kinetic evolution have been colored and labeled in the same way. So, now, every capital letter designates a group of compounds with similar kinetic behavior instead of a single species. As in monobromophenol photodegradation experiments, complex kinetic mechanisms based on parallel or high-order reactions could be suggested for the photodegradation of bromophenols with higher degree of bromination. No more mechanistic detail can be given for these systems, since it is virtually impossible to unequivocally find the real reaction scheme among the huge number of potential combinations of parallel and high-order reactions that could be postulated for photodegradations involving such a number of photodegradation products.

It is interesting to note that, in all the photodegradations studied, the sequence of elution is generally inverse to the sequence of the emergence of compounds in the kinetic process. Thus, end products tend to show up in the earliest time window and the slight time differences in the emergence of groups of intermediates show the same chronological trend. This tendency would be consistent with the gradual debromination of these compounds under the action of light. Knowing that homolog groups of bromophenols appear in the same time window owing to their similar elution behavior and having as a reference the retention times available for parental compounds (see Fig. 2), time windows from 1.1 to 6.2 min can be associated to monobromophenol congeners and related photoproducts, time windows from 6.3 to 20.9 min can be related to dibromophenols, tribromophenols and other photoproducts, and time windows from 21.8 to 33.4 min would enclose

Table 3

Chromatographic (retention times) and structural (relevant m/z) information for photoproducts and parental compounds detected during the bromophenol photodegradation processes. The possible identity and presence in the different degradation processes is detailed for each detect compound.

Retention time		m/z	Possible compound	Parental compound	Identification in kinetic plots ^a
Time window 1.1–6.2 min	1.3–1.6	79/81	HBr, aliphatic compounds with bromine	2BP, 3BP, 4BP, 24DBP, 246TBP, PBP	$[c]^{\perp}, [c]^{\perp}, [c]^{\perp}, [A]^{\perp}, [A]^{\perp}, [A]^{\perp}$
	1.5–1.8	79/81	HBr, aliphatic compounds with bromine	2BP, 3BP, 4BP, 24DBP, 246TBP, PBP	$[e]^{\perp}, [e]^{\perp}, [e]^{\perp}, [A]^{\perp}, [A]^{\perp}, [A]^{\perp}$
	2.8–3.0	109	Dihydroxybenzene, cyclopentadienic acid	2BP, 3BP, 4BP	$[b]^{\perp}, [b]^{\perp}, [b]^{\perp}$
	2.6–2.8	79/81	HBr, aliphatic compounds with bromine	PBP	$[B]^{\perp}$
	2.6–2.8	79/81 135/137	Aliphatic compounds with bromine	24DBP	$[B]^{\perp}$
	3.5–3.6	138	Methoxycyclopentadienic acid	2BP, 3BP, 4BP, 24DBP,	$[d]^{\perp}, [d]^{\perp}, [d]^{\perp}, [B]^{\perp}$
	3.7–3.8	79/81 265/267/269	Dibromodihydroxybenzene	PBP	$[B]^{\perp}$
	4.0–4.2	79/81 189/191	Monobromodihydroxyhexatriene	PBP	$[B]^{\perp}$
	5.0–5.5	79/81 171/173	2BP	2BP, 24DBP, 246TBP	$[a]^{\perp}, [B]^{\perp}, [B]^{\perp}$
	5.6–5.7	79/81 171/173	3BP	3BP, PBP	$3BP^{\perp}, [B]^{\perp}$
5.6–5.8	79/81 171/173	4BP	2BP, 4BP, 24DBP, 246TBP, PBP	$[f]^{\perp}, 4BP^{\perp}, [B]^{\perp}, [B]^{\perp}, [B]^{\perp}$	
Time window 6.3–20.9 min	6.3–6.6	79/81 343/345/347/349	Tribromodihydroxybenzene	PBP	$[D]^{\perp}$
	7.2–7.6	79/81 279/281/283	Dibromohydroxybenzenedione	PBP	$[D]^{\perp}$
	7.8–8.0	79/81 249/251/253	Dibromophenol	246TBP; PBP	$[C]^{\perp}, [C]^{\perp}$
	8.2–8.8	79/81 279/281/283	Dibromohydroxybenzenedione	PBP	$[D]^{\perp}$
	8.8–9.2	79/81 249/251/253	Dibromophenol	PBP	$[C]^{\perp}$
	9.0–9.4	79/81 420/422/424/426/428	Tetrabromohydroxybenzenone	PBP	$[C]^{\perp}$
	9.3–10	79/81 249/251/253	24DBP	24DBP, 246TBP, PBP	$[C] = 24DBP^{\perp}, [C]^{\perp}, [D]^{\perp}$
	12.2–12.6	79/81 279/281/283	Dibromohydroxybenzenone	PBP	$[C]^{\perp}$
	12.2–12.8	79/81 420/422/424/426/428	Tetrabromohydroxybenzenone	PBP	$[D]^{\perp}$
	13.8–14.2	79/81 357/359/361/363	Tribromohydroxybenzenone	PBP	$[C]^{\perp}$
	14.0–14.8	79/81 327/329/331/333	Tribromophenol	PBP	$[D]^{\perp}$
	17.0–18.0	79/81 327/329/331/333	Tribromophenol	PBP	$[D]^{\perp}$
	17.7–18.7	79/81 327/329/331/333	Tribromophenol	PBP	$[D]^{\perp}$
	18.5–19.7	79/81 327/329/331/333	246TBP	246TBP, PBP	$[D]^{\perp} = 246BP, [D]^{\perp}$
Time window 21.8–33.4 min	23.0–24.0	79/81 435/437/439/441/443	Tetrabromomethoxyphenol	PBP	$[E]^{\perp}$
	26.5–27.5	79/81 405/407/409/411/413	Tetrabromophenol	PBP	$[E]^{\perp}$
	28.0–29.0	79/81 405/407/409/411/413	Tetrabromophenol	PBP	$[E]^*$
	28.5–29.0	79/81 405/407/409/411/413	Tetrabromophenol	PBP	$[E]^{\perp}$
Time window 38.5–48.5 min	42–44	79/81 483/485/487/489/491/493	PBP	PBP	$[F]^{\perp}$

^aThe sequence in "Identification in kinetic plots" match with the sequence in "Parental compound", [⊥] Fig. 7, ^{*}Fig. 8

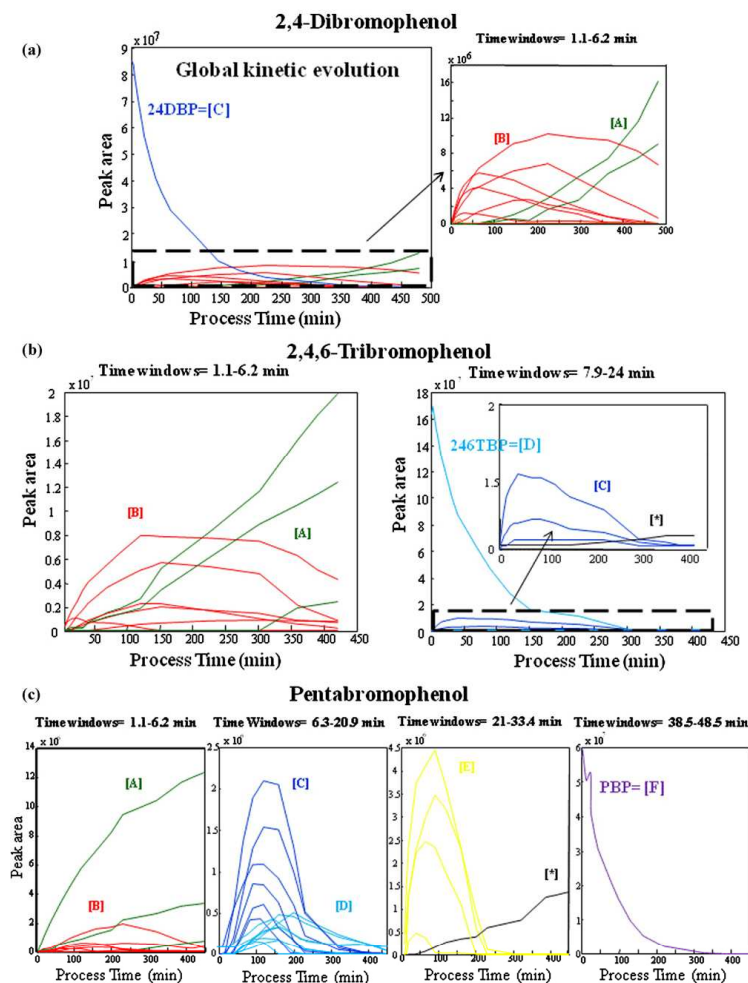


Fig. 8. Evolution of the area of the resolved peaks as a function of process time for the degradation of (a) 2,4-dibromophenol, (b) 2,4,6-tribromophenol and (c) pentabromophenol. Capital letters design groups of compounds with similar kinetic evolution. In general, the sequence [A], [B], [C], [D], [E] and [F] reflects increasing degree of bromination in the related compound class. * are unidentified photoproducts. (The readers should refer to the on-line version to visualize the colors in this figure.)

tetrabromophenols. Therefore, in general, the sequence [A], [B], [C], [D], [E] and [F] in Fig. 8 should be attributed to compounds with an increasing degree of bromination.

To have a more complete interpretation of the formed photoproducts, we investigated the MS resolved spectra for these processes. The information of the photoproducts obtained from the bromophenol experiments is summarized in Table 3, where the identity, the photodegradation origin and the kinetic behavior of more than 30 photoproducts is collected. Photoproducts have been characterized by looking at the features in their mass spectra and at their retention times. In this sense, since the retention times for the parental compounds were available, some of the homologs could be unambiguously identified. In all highly brominated photodegradation experiments, many generated photoproducts were identified as less brominated bromophenols. Thus, reductive debromination by successive losses of bromine atoms is confirmed as the main

photodegradation pathway of bromophenols. Besides, other results obtained suggest that substitution of a bromine atom by a hydroxyl groups is also one of the major pathways in the photodegradation process, in agreement with photodegradation mechanisms of chlorophenols [18–20]. Indeed, many compounds with one or more hydroxyl groups can be found in the time windows related to tri-brominated and lowly brominated compounds. Due to the limited selectivity of our MS detection system and to the lack of available standards for the large number of potential products formed, it was possible to distinguish between homolog classes (different number of bromine atoms, presence and number of hydroxyl group...), but it was not possible to identify within a same class the substitution pattern of the bromine atoms or other functional groups.

After detailing the identity, kinetic evolution and main photodegradation pathways for all bromophenols, a quantitative comparison of the results obtained for the decay of the parental

Table 4
Photolysis decay rate of parental bromophenols.

Bromophenols	k_1 ($\times 10^2$) (min^{-1})
2BP	1.18 (4) ^a
3BP	1.14 (6)
4BP	2.2 (2)
24DBP	1.56 (5)
246TBP	1.67 (4)
PBP	1.8 (2)

^a Values in parenthesis are the errors related to the estimation of the photolysis decay rates.

compound in the photodegradation experiments of the isomers has been carried out.

Based on the assumption that the photolysis decay of the parental compound follows a pseudo first-order model, the general kinetic equation:

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (6)$$

where k_1 is the rate constant of the photodegradation decay and $[A]$ is the concentration of the parental bromophenol, is fitted to the evolution of the peak area of the compound of interest as a function of process time. At $t=0$ (standard first aliquot injected before UV light exposure), the peak area of the bromophenol is taken as $[A]_0$. The non-linear Newton–Gauss–Levenberg/Marquardt (NGL/M) algorithm has been used to perform the fitting and obtain the rate constant and its related error [43,44]. Table 4 shows the values of the photolysis decay obtained for each bromophenol studied.

In agreement with the conclusions of reported studies of their analogues (the chlorophenols) bromine position in bromophenols isomers influences significantly on the kinetics of bromophenols photodegradation [19]. The results showed that heterolytic scission of the C–Br bond in the para-position is favorable in direct photolysis, which is probably a result of a steric effect. This is the reason why the 4-bromophenol decays significantly faster than the rest of bromophenols. As a secondary trend, we can conclude that the photodegradation of higher brominated bromophenols seems to be slightly faster than lower brominated compounds, which is in agreement with the conclusions of photodegradation studies of other BFRs [12,17].

5. Conclusions

The results obtained have shown the complexity of the photodegradation processes of bromophenols and the very similar spectra and kinetic evolution of the products obtained justified the use of HPLC–DAD–MS chromatographic monitoring (with the extra information of the elution direction) instead of classical UV–vis spectroscopic monitoring. Analysis of DAD multiset structures provided a good global kinetic picture of the process, since homolog species and minor compounds could be properly distinguished, whereas analysis of MS multiset structures provided the structural information needed to identify the formed photoproducts.

The kinetic information suggests extremely complex reactional schemes, involving many parallel or high-order reactions. Nevertheless, in highly brominated bromophenols, there seems to be different groups of intermediates that follow a sequential emergence and decay. The interpretation of the MS spectra has shown how reductive debromination by successive losses of bromine atoms and substitution of bromine atoms by hydroxyl groups are the main photodegradation pathways of bromophenols. The decay of the parental compounds shows how the bromine position in the monobromophenol isomers influences significantly the kinetics of photodegradation. Thus, bromine in para-position produces an increase of reaction rate. Moreover, a slight increase of the

degradation process was observed as the degree of bromination increased.

The combined mathematical and chromatographic resolution method presented here can be proposed as a general procedure for the study of photodegradation processes of a wide variety of environmental pollutants of interest. The time-windowing strategy, the inclusion of the elution direction as a crucial additional information to differentiate among compounds and the use of MS detection for characterization provides a reliable methodology for process analysis of systems involving a very large number of compounds (more than 30 in the case of pentabromophenol). However, the large amount of compounds and the enormous number of possibilities to set reactional schemes in highly brominated systems prevents the unequivocal choice of one preferred scheme over others. In the case of monobromophenols, where less compounds are involved in the photodegradation process, future works will attempt the analysis of fused chromatographic and classical spectroscopic data by the hybrid hard- and soft-modeling MCR-ALS method, with the aim of setting a detailed reaction scheme and derive the related rate constants, providing in this way a more accurate elucidation of the mechanism of these degradation processes.

Acknowledgements

We acknowledge funding from the Spanish government (grant CTQ2009-11572 and CTM2008-03263/TECNO). The authors of this work belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2009 SGR 45). Silvia Mas acknowledges a Ph.D. grant UAC 2005-0071 from the Ministry of Education and Science (Associated Unit between University of Barcelona and CSIC).

References

- [1] C.A. de Wit, *Chemosphere* 46 (1991) 583.
- [2] G. Söderström, U. Sellström, C.A. de Wit, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 127.
- [3] J.M. Norris, J.W. Ehrmantraut, C.L. Gibbons, R.J. Kociba, B.A. Schwetz, J.Q. Rose, C.G. Humiston, G.L. Jewett, B.W. Crummett, P.J. Gehring, J.B. Tirsell, J.S. Brosier, *Appl. Polym. Symp.* 22 (1973) 195.
- [4] I. Watanabe, R. Tatsukawa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (1987) 953.
- [5] S. Otha, H. Nishimura, T. Nakao, O. Aozasa, H. Miyata, *Organohalogen Compd.* 52 (2001) 321.
- [6] J. Eriksson, N. Green, G. Marsh, A. Bergman, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3119.
- [7] A. Palm, I.T. Cousins, D. Mackay, *Environ. Pollut.* 117 (2002) 195.
- [8] J. Bezares-Cruz, C.T. Jafvert, I. Hua, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4149.
- [9] L. Sánchez-Prado, M. Lores, M. Llopart, C. García-Jares, J.M. Bayona, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 157.
- [10] I. Hua, N. Kang, C.T. Jafvert, J.R. Fàbrega-Duque, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 798.
- [11] J. Niu, Z. Shen, Z. Yang, X. Long, G. Yu, *Chemosphere* 64 (2006) 658.
- [12] M. Barcellos da Rosa, H.-U. Krüger, S. Thomas, C. Zetzsch, *Fresenius Environ. Bull.* 12 (2003) 940.
- [13] M.Y. Ahn, T.R. Filley, C.T. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz, *Environ. Toxicol. Chem.* 40 (2006) 215.
- [14] M.Y. Ahn, T.R. Filley, C.T. Jafvert, L. Nies, I. Hua, J. Bezares-Cruz, *Chemosphere* 64 (2006) 1801.
- [15] A. Palm, R. Kopetzky, W. Sossinka, W. Ruck, C. Zetzsch, *Organohalogen Compd.* 66 (2004) 4105.
- [16] J.D. Raff, R.A. Hites, *Environ. Toxicol. Chem.* 41 (2007) 6725.
- [17] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, *Chemosphere* 54 (2004) 117.
- [18] M. Czaplicka, A. Czaplicki, *J. Photochem. Photobiol. A* 178 (2006) 90.
- [19] H.D. Burrows, L.S. Ernestova, T.J. Kemp, Y.I. Skurlatov, A.P. Purmal, A.N. Yermakov, *Prog. React. Kinet. Mech.* 23 (1998) 145.
- [20] S. Rayne, K. Forest, K.J. Friesen, *Environ. Int.* 35 (2009) 425.
- [21] N. Akai, S. Kudoh, M. Takayanagi, M. Nakata, *Chem. Phys. Lett.* 363 (2002) 591.
- [22] H.I. Joschek, S.I. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3269.
- [23] F. Bonnichon, C. Richard, G. Grabner, *Chem. Commun.* (2001) 73.
- [24] G. Guyon, P. Boule, J. Lemaire, *Nouv. J. Chim.* 8 (1984) 685.
- [25] G. Grabner, C. Richard, *Hdb. Env. Chem.* 2 (2005) 161.
- [26] E. Lipczynskakochany, *Chemosphere* 24 (1992) 911.
- [27] S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 18.
- [28] M. de Luca, S. Mas, G. Iole, F. Oliverio, G. Ragno, R. Tauler, *Int. J. Pharm.* 386 (2010) 99.
- [29] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst. Syst.* 54 (2000) 123.

- [30] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
- [31] R. Tauler, A. Smilde, R. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [32] S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, 2009, pp. 325–344.
- [33] S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, 2009, pp. 473–506.
- [34] K. Johnson, A. De Juan, S.C. Rutan, *J. Chemom.* 13 (1999) 331.
- [35] E. Bezemer, S.C. Rutan, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 60 (2002) 239.
- [36] A. De Juan, R. Tauler, *J. Chromatogr., A* 1158 (2007) 184.
- [37] P. Jonsson, A.I. Johansson, J. Gullberg, J. Trygg, A. Jiye, B. Grung, S. Marklund, M. Sjöström, H. Antti, T. Moritz, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5635.
- [38] Y. Shen, R. Zhang, R.J. Moore, J. Kim, T.O. Metz, K.K. Hixson, R. Zhao, E.A. Livesay, H.R. Udseth, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3090.
- [39] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101.
- [40] E. Peré-Trepat, R. Tauler, *J. Chromatogr., A* 1131 (2006) 85.
- [41] M. Amrhein, B. Srinivasan, D. Bonvin, M.M. Schumacher, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 33 (1996) 17.
- [42] A. Izquierdo-Ridorsa, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 183.
- [43] M. Maeder, A.D. Zuberbühler, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2220.
- [44] G. Puxty, M. Maeder, K. Hungerbühler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 81 (2006) 149.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques[☆]

Anusha Jayaraman^a, Sílvia Mas^{a,b,*}, Romà Tauler^b, Anna de Juan^a

^a Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2012

Accepted 23 March 2012

Available online xxx

Keywords:

Multivariate Curve Resolution-Alternating

Least Squares (MCR-ALS)

Hybrid soft- and

hard-modeling-Multivariate Curve

Resolution (HS-MCR)

Photodegradation process

Process analysis

ABSTRACT

This work is focused on the study of the photodegradation of 2-bromophenol under the action of UV light and sunlight. The photodegradation process has been monitored using UV–Vis spectroscopy and High Performance Liquid Chromatography coupled to diode array and mass spectrometry detectors in tandem (HPLC–DAD–MS). Multivariate resolution methods, such as Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) and hybrid soft- and hard-modeling-Multivariate Curve Resolution (HS-MCR), have been applied to the experimental data to obtain the information about the kinetic evolution and identification of the compounds involved in the photodegradation process. From the analysis of HPLC–DAD results, the complexity of the photodegradation process has been confirmed. Ten components were found to be involved in parallel, second- or higher-order reactions, which could not be ascertained from the spectroscopic results. The HPLC–MS results allowed postulating the identity of some of the compounds (such as hydroxyderivatives and bromophenol homologs) which resulted from the reactions of photohydrolysis, debromination and bromine transfer to different position of the phenol ring. The effect of the UV light and sunlight on the photodegradation process was found to affect mainly the rate of the reaction, but not the identity of the photoproducts formed. The advantages and limitations of the spectroscopic and chromatographic analysis were also discussed. The potential of combining spectroscopic and chromatographic data in a single multiset structure was also shown. This strategy, uses the advantage of the good definition of the process time axis from the spectroscopic experiment and the capability to distinguish among compounds, linked to the use of chromatographic information.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Brominated flame retardants (BFR's) have been used since long and are persistently found in the environment, where they cause contamination and biohazard effect [1]. 2-Bromophenol is a small compound that can be formed by the thermal degradation of some flame retardants [2]. 2-Bromophenol undertakes hazardous reactions with acyl chlorides, acid anhydrides and oxidizing agents. It is used as a precursor to resorcinol and could be released to environment through waste streams. Furthermore, it has been found to cause skin, eye, mucous membranes and upper respiratory tract irritations, with varying effects depending on the duration and intensity of chemical exposure [3]. Due to these implications and

the limited information about their fate in the environment, it is needed to study the chemical photodegradation of this compound.

As an environmental pollutant, 2-bromophenol is exposed to different natural radiation sources and, therefore, it is relevant to know the pathway and products derived from the photoinduced processes. Upon exposure to UV light or sunlight, the bromophenols in aquatic environment undergo photochemical changes. Preliminarily, we could expect that the UV light induced an increase in the rate of reactions with respect to the sunlight due to the shorter wavelength and higher energy of the UV radiation. However, there is no knowledge on how these different radiation sources could affect the identity of the photoproducts formed. There have been studies on the decomposition of monochlorophenols by UV irradiation [4] and under sunlight [5,6], and a study on the flash photolysis of monobromophenols [7], but a description of the kinetic pathways of bromophenols is not clear yet. Since the lowly brominated compounds were seen to undergo degradation phenomena under the action of UV light [8], a deeper study of the photodegradation of these compounds under different illuminating sources has a clear environmental relevance.

[☆] This paper belongs to the Special Issue Chemometrics in Chromatography, Edited by Pedro Araújo and Bjørn Grung.

* Corresponding author at: Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 647, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 403 44 45; fax: +34 93 402 12 33.

E-mail address: silviamas@ub.edu (S. Mas).

The present work attempts to study the photodegradation of 2-bromophenol under UV light and sunlight by monitoring this process with UV–Vis spectrophotometry and chromatographic techniques with UV and MS detection. The use of chromatographic and UV–Vis spectroscopic techniques helps to identify the photodegradation products and to describe their kinetic evolution. Since the process of photodegradation of these compounds is expected to be complex, chemometric tools involving multivariate analysis are used to treat the data obtained from the spectroscopic and chromatographic monitoring experiments. Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR–ALS) has been used to analyze the chromatographic data [9–11]. This tool helps in determining the number of compounds present in the system and their identity through the mathematical resolution of the overlapping chromatographic peaks. Upon applying this technique, the general trend of change in concentration (peak areas) of the individual components as a function of process time can be found. This information comes from the simultaneous analysis of sampling aliquots of the 2-bromophenol solution collected at different process times. In principle, a better kinetic description of the photodegradation can be obtained by monitoring the photodegradation process spectroscopically, since many spectra can be collected in very short periods of time, spanning the process time axis in much more detail than few chromatographic aliquots. Hybrid soft- and hard-modeling–Multivariate Curve Resolution (HS–MCR) [12], a variant of MCR–ALS that allows for introducing kinetic hard-modeling information, was used to treat the spectroscopic data and provided process profiles and rate constants related to the process. However, there is a limitation linked to the sole use of spectroscopic data and it is that compounds with identical or linearly related kinetic profiles will not be distinguished. To overcome this problem, the combined analysis of spectroscopic and chromatographic data, put into a single multiset structure, has been the option adopted. Applying MCR–ALS to this combined spectroscopic/chromatographic data set allowed for modeling all components in the photodegradation process and for a better description of the kinetic evolution.

Previous studies by the research group have shown the capability of the application of HS MCR to the analysis of spectroscopic data [13,14] and of MCR–ALS to the HPLC–DAD–MS data [8], both for the photodegradation of compounds under UV light. The aim of the study of the 2-bromophenol photodegradation is providing additional insight into the evolution of pathways and mechanisms involved in this process under different kinds of light sources and the identification of the photoproducts formed. These results will help in a better understanding of the fate of this compound in the natural environment.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

2-Bromophenol (Sigma–Aldrich, Germany), acetic acid (Panreac Quimica SA, Spain), ammonium acetate (Merck, Germany) and ammonia solution (Merck, Germany), of analytical grade were used without further purification. MilliQ water of conductivity <0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Millipore) was used for the preparation of sample and reagent solutions. Methanol for HPLC from Lichrosolv® (Merck, Germany) and water for HPLC from Chromasolv® (Sigma–Aldrich, Switzerland) were used for the HPLC analysis.

The mobile phase for chromatography consisted of 50% methanol and 50% aqueous acetic acid/acetate buffer, pH 3.5. 2-Bromophenol solutions of concentrations between $1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ and $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ were prepared in mobile phase by dilution of the initial liquid compound.

2.2. Apparatus

The UV light-induced bromophenol photodegradation was carried out with a setup formed by a photoreactor (Hereaus Noblelight, Germany), with a glass container (volume 0.7 L) and a 15 W UV low-pressure mercury vapor lamp, emitting predominantly at 254 nm, placed inside a quartz tube.

Sunlight bromophenol degradation was carried out using a sunlight simulating instrument (Suntest, manual CPS, Atlas) consisting of 560 cm^2 exposure area irradiated by an air cooled xenon arc lamp operating between 35 °C and 100 °C (Black Standard Temperature, BST). Suntest allows regulation of the irradiance and light time exposure.

Spectroscopic process monitoring was performed using a Diode array UV–Visible spectrophotometer (Agilent 8453, software: UV–Visible Chemstation). A peristaltic pump (Watson Marlon 505DU) was used for the continuous flow system between the photoreactor and the spectrophotometer in the UV-induced photodegradation experiments.

HPLC setup consisted of a High Performance Liquid Chromatography unit (Waters 2690 series, Milford, MA), a UV–Visible diode array detector (DAD, Waters 9960 series) and a benchtop triple quadrupole mass spectrometry detector (MS, Quattro LC, Micromass, Manchester, UK) connected in tandem. In the mass spectrometry detector, the ionization source was the Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) in negative mode and the software used for analysis was MassLynx V4.0. A pH-meter (pH 510, XS instruments) was used to adjust the pH of the mobile phase.

2.3. Experimental setup and procedure

2.3.1. Photodegradation studies under UV light

The bromophenol solution is irradiated under UV light in the photoreactor, while the liquid is circulated from the reactor to the spectrophotometer and vice versa. This setup forms a closed and continuous system.

2.3.1.1. Spectroscopic monitoring experiments. UV–Vis spectra of the bromophenol solution circulating from the photoreactor were collected every 30 s with a spectral resolution of 1 nm in the wavelength range of 209–450 nm.

2.3.1.2. Chromatographic monitoring experiments. Aliquots were collected from the UV photoreactor at different time intervals and analyzed with the chromatographic system. A higher number of aliquots was collected in the beginning of the process because of the faster evolution observed in the spectroscopic monitoring experiments and was gradually reduced towards the end.

The experimental conditions for chromatographic analysis included the use of a reversed phase C18 Phenomenex column, Gemini 5u 110 Å, 150 mm \times 4.6 mm I.D., particle size 5 μm . 30 μL sample volume were injected and the flow of mobile phase was set at 1 mL/min with isocratic elution throughout the analysis. The eluted components were detected by a UV–Vis diode array and a mass spectrometry detector connected in tandem. The UV–DAD detector operated in a wavelength range from 190 to 400 nm with 1 nm spectral resolution and a sampling rate of 1 spectrum/s. In the MS detector, the conditions for APCI source were -3.0 kV capillary voltage, -30 V cone voltage, 150 and 500 °C source and desolvation temperatures, respectively, 48 L/h of nitrogen (99.999% purity) flow for the cone gas and 325 L/h for the desolvation gas. MS detection was performed in scan mode with an m/z range from 70 to 190, scan duration of 1 s/scan and an interscan duration of 0.1 s.

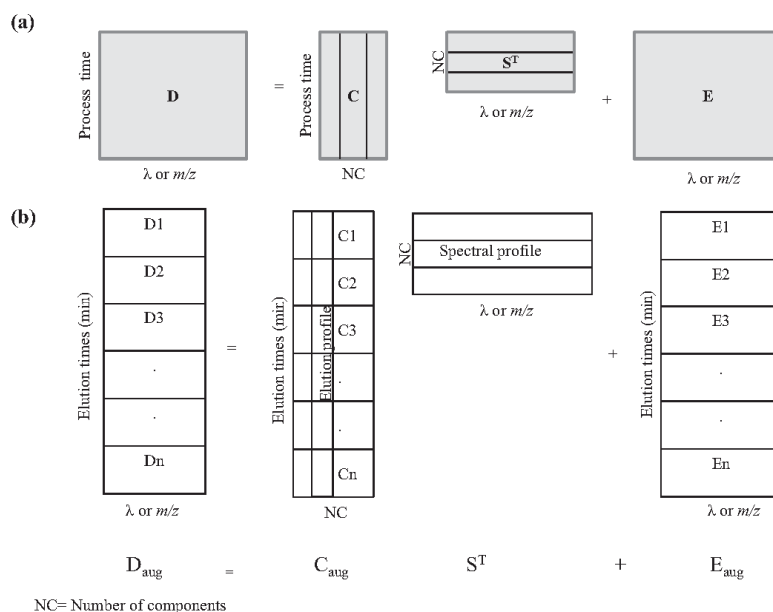


Fig. 1. (a) Bilinear model of a spectroscopic monitoring experiment-single data set structure. (b) Bilinear model of data set formed by all the chromatographic runs acquired during a process (multiset structure).

2.3.2. Photodegradation studies under simulated sunlight

The bromophenol solution was put in 20 mL quartz tubes and exposed to the xenon lamp light (irradiance set to 600 W/m²/nm) to induce the photodegradation process. Aliquots were taken at different process times to be analyzed using the same chromatographic setup and conditions as in UV photodegradation experiments. Spectroscopic monitoring was not carried out because of the impossibility to have a continuous setup connected to the spectrophotometer and the limited volume of working bromophenol solution that could be exposed in the sunlight simulator chamber.

3. Data treatment

3.1. Data set and data structure

The measurements acquired during the spectroscopic and chromatographic monitoring experiments can be organized as data tables or raw data matrices, D . In the case of spectroscopic monitoring, the rows correspond to the UV–Vis spectra recorded at different process times, while the columns correspond to the kinetic traces at each wavelength (see Fig. 1a). In the case of a chromatographic run, the columns correspond to chromatograms and the rows to the detector response at the different elution times. For DAD detection, the rows are the UV–Vis spectra, whereas in the case of MS detection, the rows are the MS spectra at the different elution times.

In all the experiments mentioned, the D matrix obeys the bilinear model shown in Fig. 1a:

$$D = CS^T + E \quad (1)$$

C and S^T contain as many profiles as pure components in the raw data set D (NC). In this work, the S^T matrix contains always the pure spectra (UV or MS) of the components involved in the photodegradation process, whereas the C matrix consists of the kinetic profiles

of the reaction in the spectroscopic monitoring experiments and of the elution profiles if the data set relates to a chromatographic run. The E matrix contains the experimental error or variance unexplained by the bilinear model.

The given bilinear model is for a single data set, such as the one of a spectroscopic monitoring experiment or that related to a single chromatographic run. When a process is monitored chromatographically, there are n data sets for the whole experiment, one per each aliquot or sample injected at a particular process time of the photodegradation. They are treated together, as a multiset structure, to get complete information about the whole experiment. For the chromatographic experiments in this study, a column-wise augmented multiset structure was chosen, as represented in Fig. 1b. D_{aug} and C_{aug} are the column-wise augmented data matrices, constructed from n D_i submatrices of raw data and n C_i submatrices of elution profiles, each pair of them related to a chromatographic run, and S^T is the single matrix of pure spectra, common to all chromatographic runs.

To extract more information from the experimental data, a column-wise augmented multiset structure coupling data from the spectroscopic monitoring experiment and some selected information from the chromatographic multiset with UV–DAD detection was also constructed that allowed performing a combined analysis of spectroscopic/chromatographic data.

3.2. Data pretreatment

Before proceeding to investigate to the photodegradation process, the raw data were pretreated in order to improve the quality of the signal and to reduce the data size.

Asymmetric least squares was employed to correct the baselines of HPLC–DAD chromatograms when necessary, since it can handle appropriately baselines of irregular shapes in data sets where

Table 1

General table of experiments and conditions for spectroscopic and chromatographic monitoring of 2-bromophenol photodegradation.

Experiment	Light source	Experimental technique	Conc ^a ($M \times 10^{-4}$)	Time (min) ^b	D_{DAD}	D_{MS}	N^c
1	UV	Spectroscopy	1.4	540	D1	–	–
2	UV	Spectroscopy	1.4	540	D2	–	–
3	UV	Spectroscopy	1.4	540	D3	–	–
4	UV	Chromatography	1.4	90	DC4	–	18
5	UV	Chromatography	1.4	420	DC5	DM5	27
6	UV	Chromatography	7	420	–	DM6	27
7	Sun light	Chromatography	1.4	420	DC7	DM7	27
8	Sun light	Chromatography	7	420	DC8	DM8	24

^a Conc: concentration.^b Time (min): total time of degradation (min).^c N : number of aliquots.

the significant signal (peaks) is much narrower than the baseline contribution [15].

HPLC–MS chromatographic runs were compressed in the response direction by removal of m/z channels that were noisy and unrelated to any elution peak. Such a reduction was performed by suppressing all m/z channels whose mean intensity was below 2% of the maximum intensity channels. This yielded approximately 3-fold reduction as compared with the size of the raw data set.

3.3. Resolution of experimental data: Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares

Multivariate Curve Resolution (MCR) methods are used for the analysis of multicomponent systems. They aim at resolving the mixed, real, raw data matrix (**D**) into the bilinear model **CS^T**, formed by the pure spectra (**S^T**) and concentration profiles (**C**) of the underlying components [9,16]. MCR belongs to the family of soft-modeling methods, since it does not impose any mathematical model to describe the shape of the profiles in the **C** and **S^T** matrices. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is the iterative resolution method that is adopted in this study to resolve the spectroscopic and chromatographic data [9–11].

The steps of the algorithm include the determination of the number of components in **D** by rank analysis methods, such as the Singular Value Decomposition [17]. Then, an initial **C** or **S^T** matrix with as many profiles as the number of components estimated for **D** is constructed to start the iterative resolution process. Here, the initial **S^T** was found using SIMPLISMA [18]. Once the initial estimate is generated, the iterative optimization step is started. In each iterative cycle, the **C** and **S^T** matrices are calculated under constraints in two least-squares steps:

$$\mathbf{C} = \mathbf{DS}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1} \quad \text{and} \quad \mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}. \quad (2)$$

A reconstructed **D^{*}** matrix from the product of the calculated matrices **CS^T** is then compared with the original **D** matrix and the iterative optimization continues until the convergence criterion is fulfilled. The convergence criterion is achieved when the variation of results between consecutive iterations goes below a preset threshold value or when a certain number of iterations are exceeded. The quality of the final MCR model can be assessed by comparing the reconstructed matrix **D^{*}** with the raw data matrix **D**. Indicators for this purpose are the percentage of lack of fit (%LOF):

$$\%LOF = 100 \times \sqrt{\frac{\sum e_{ij}^2}{\sum d_{ij}^2}} \quad (3)$$

where e_{ij} is equal to $d_{ij} - d_{ij}^*$ (d_{ij} is an element of the raw **D** matrix and d_{ij}^* is the same element in the reconstructed **D^{*}** matrix) and the percentage of variance explained, R^2 , given by the equation:

$$R^2 = 100 \times \left(1 - \frac{\sum e_{ij}^2}{\sum d_{ij}^2} \right) \quad (4)$$

Certain constraints have to be applied in the optimization steps so as to provide meaningful shapes for the profiles in **C** and **S^T** and to minimize as much as possible the rotational or intensity ambiguity phenomena [11,19]. Constraints are chemical or mathematical properties that the profiles in **C** and/or **S^T** must fulfill. The calculated profiles are modified so that they obey the constraint condition [11]. The constraints can be applied in a flexible way [20], in **C** and/or **S^T** directions, differently in each profile within **C** and **S^T** or differently in the submatrices while using a multiset structure. The constraints used in this study are non-negativity, unimodality in elution profiles, local rank or selectivity in some elution windows [9,10,16] and spectra normalization. Hard-modeling was also used as an additional constraint by imposing a physicochemical model into the resolution and forcing the concentration profiles to obey the shapes described by a particular kinetic model. The introduction of this constraint gives rise to the hybrid soft- and hard-modeling variant of MCR (HS-MCR) that provides **C**, **S^T** and the related parameters (rate constants) of the hard model [12,21]. In multiset structures, the constraint of correspondence among species played a significant role, since it allowed encoding the information related to the presence/absence of some components in the different **C_i** submatrices. The use of this information enabled a better definition of the pure spectra and their related concentration profiles.

In order to consider that the resolution results of an analysis are good, the variance explained must be sufficiently high and the concentration profiles and spectra obtained must be chemically meaningful and show shapes consistent with the variation in the raw data sets.

4. Results and discussion

Table 1 shows the experimental conditions of the spectroscopic and chromatographic monitoring experiments under UV and sun-light.

4.1. Spectroscopic monitoring

Spectroscopic monitoring was performed by running the photodegradation under UV light and simultaneously collecting UV–Vis spectra every 30 s. In all experiments, SVD pointed out the presence of four components. MCR-ALS was performed using spectral estimates built with SIMPLISMA and applying the constraints of non-negativity in the spectral and concentration directions, unimodality and selectivity in the concentration direction, and

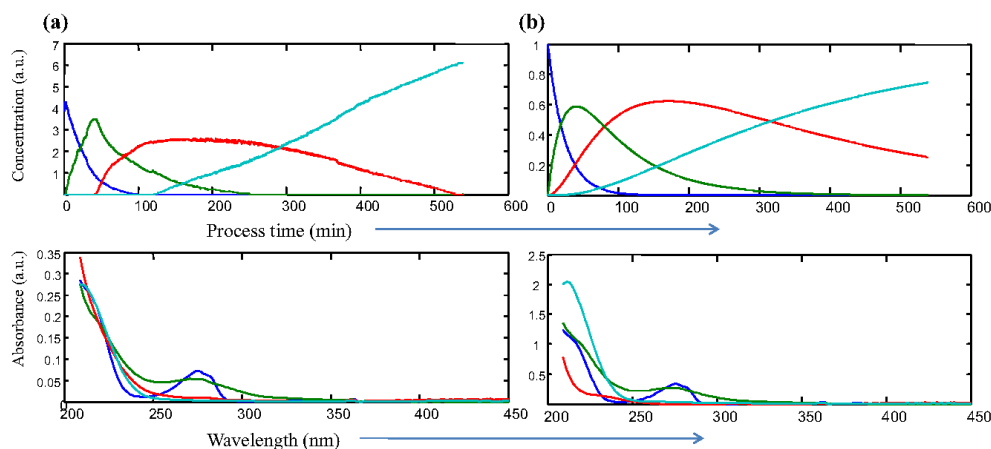


Fig. 2. Results for spectroscopic monitoring of 2-bromophenol degradation under UV light (experiment D2). (a) MCR-ALS kinetic profiles and related pure spectra. (b) HS-MCR kinetic profiles and related pure spectra (2-bromophenol is in dark blue. The other colors refer to photoproducts). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

normalization in the spectral direction. Fig. 2a shows the concentration profiles (C) and spectra (S^T) obtained from this analysis.

The lack of fit obtained was 1.14% and the variance explained was 99.99%. From the shape of the concentration profiles, a model of a series of first-order consecutive reactions could be postulated: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$. HS-MCR was afterwards applied to the data and the postulated model was included as an additional hard-modeling constraint. The final information obtained by HS-MCR includes C, S^T and the rate constants. HS-MCR was also applied to the augmented data matrices of the same experiments performed on different days to obtain more accurate estimates of the parameters. Fig. 2b shows the optimized concentration and spectral profiles after HS-MCR application. Table 2 shows the quantitative results obtained by HS-MCR method. In both the MCR-ALS and HS-MCR applications, the recovered profiles, as seen from the figures of the experiment D2, and their values of lack of fit show good similarities. The variance explained is found to be high and, hence, satisfactory for all the experiments. This fact and the meaningful shape of concentration profiles and resolved spectra support the choice of the kinetic model applied. It is also evident that the multiset analysis has a high variance explained and shows advantages with respect to the individual analysis of experiments. Multiset analysis gives more robust results, since the flip-flop ambiguity in the single analysis of experiment D1, where $k_2 > k_1$, while in the other experiments $k_1 > k_2$, was solved [22]. This ambiguity may happen in experiments where the kinetic evolution follows a first-order consecutive reaction law and refers to the fact that the values of consecutive constants can be exchanged without modifying the variance explained in the dataset. This happened in experiment D1 when analyzed alone, but it is solved in the multiset analysis.

The application of HS-MCR to the analysis of spectroscopic monitoring experiments indicates that there are only four contributions present in the system. This number of contributions would be associated straightforwardly with the number of chemical compounds in simple reaction systems. When the process is more complex, the number of detectable contributions may be lower than the real number of components due to the presence of rank-deficiency [23]. This phenomenon may occur due to the high similarity of the spectra and/or to the presence of linearly related or identical kinetic profiles among some compounds involved in the process. In order

to find out the real complexity of the photodegradation process, i.e., whether some process compounds might have been undetected, chromatographic monitoring was also carried out on this system.

4.2. Chromatographic monitoring

In the chromatographic monitoring experiments, aliquots were taken at several process times, more often in the beginning of the process because the transformation among components in the photodegradation of 2-bromophenol, both under UV and sunlight, is faster than towards the end (see Fig. 2). Table 1 describes the experimental conditions of the chromatographic experiments performed.

4.2.1. Analysis of HPLC–DAD data for UV light and sunlight photodegradation experiments

The HPLC–DAD data sets from different process times were pre-treated individually to correct baselines by using asymmetric least squares, as discussed in Section 3.2. These data sets were organized in multiset structures containing chromatographic information about the different process times, so that the information from the whole process could be retained. Because of the large amount of components seen with the DAD detector in the chromatographic runs, working with the full chromatograms was avoided. Instead, different multiset structures were built for the different elution zones (windows) and MCR-ALS was applied to each of them separately [8].

Table 3 shows the quantitative resolution results for the different LC–DAD multiset structures analyzed for the photodegradation experiments carried out under UV light and sunlight.

As in spectroscopic monitoring, the number of components was determined using SVD and purest spectral estimates were selected using SIMPLISMA. The constraints applied in the MCR-ALS analysis were non-negativity in the concentration and spectral directions, unimodality for the elution profiles in the concentration direction and normalization of the resolved spectra. The total number of components resolved for the photodegradation processes is 10 in all experiments, taking into account those of all elution windows analyzed. In the analysis of the data sets at low (D4, D5 and D7) and high (D8) concentration levels, the variance explained is generally satisfactory, almost always above 90%. No variation among

Table 2

Results of hybrid soft- and hard-modeling Multivariate Curve Resolution (HS-MCR) experiments.

Data matrix	NC ^a	Rate constants (s ⁻¹ × 10 ⁻⁴) ^b	%LOF ^c	R ^{2d}	Constraints
D1	4	k1 = 5.39 (2) k2 = 9.16 (7) k3 = 0.487 (8)	2.51	99.93	Non-negativity (C, S ^T), kinetic model
D2	4	k1 = 6.95 (4) k2 = 2.202 (7) k3 = 0.53 (1)	2.29	99.96	Non-negativity (C, S ^T), kinetic model
D3	4	k1 = 11.66 (9) k2 = 3.74 (2) k3 = 0.71 (2)	2.98	99.91	Non-negativity (C, S ^T), kinetic model
[D1;D2;D3] Multiset	4	k1 = 8.21 (8) k2 = 3.43 (2) k3 = 0.60 (2)	6.88	99.52	Non-negativity (C, S ^T), kinetic model, correspondence among species

^a NC: number of components.^b Values in parenthesis are errors associated to the kinetic fitting optimization.^c %LOF: percentage lack of fit.^d R²: percentage variance explained.

the number and identity of the components was detected at the different concentration levels of the experiments performed when the same kind of light source was used.

Fig. 3a and b shows all the resolved spectral and elution profiles of the complete experiment **D5**. Fig. 3c and d shows the same results for the sunlight photodegradation experiment **D7**. The pure spectra and concentration profiles for the same compound share the same color in the figures. These plots contain the overlapped results of all window multisets analyzed.

As can be seen in both UV and sunlight photodegradation, many resolved spectra are very similar among components. These components could be resolved because of the difference among their elution behaviors and the fact that the different elution time windows were treated separately. Fig. 3b and d give a first impression of the kinetic evolution of the resolved components through the changes in intensity of the elution profiles along the process runs.

Table 3

UV light and sunlight photodegradation – results from HPLC–DAD.

Data matrix	Number of components	% Variance explained (R ²)
UV light photodegradation experiment		
DC4 Time window (min):	10	
1.001–3.24	4	96.95
3.25–4.76	3	96.36
6.008–7.74	1	92.16
7.76–9.9	1	99.95
10.51–12.75	1	65.87 ^a
DC5 Time window (min):	10	
1.001–3.24	4	97.79
3.25–4.76	3	96.33
6.008–7.74	1	95.60
7.76–9.9	1	99.90
10.51–12.75	1	90.15
Sunlight photodegradation experiment		
DC7 Time window (min):	10	
1.001–3.24	3	90.87
3.25–4.76	4	99.88
6.008–7.74	1	93.89
7.76–9.9	1	99.98
10.51–12.75	1	96.43
DC8 Time window (min):	10	
1.001–3.24	4	99.88
3.25–4.01	2	98.04
4.01–4.76	1	99.99
6.008–7.74	1	96.68
7.76–9.9	1	99.99
10.51–12.75	1	99.46

^a Low variance explained is due to the low signal-to-noise ratio (s/n) of the minor compound modeled.

Please note that the total duration of the experiment **DC4** is much shorter than the rest of experiments.

For UV photodegradation, the decay of 2-bromophenol (dark blue profile) is fast, many intermediate species emerging and decaying are detected, and a few components keep increasing until the end of the process. In the case of sunlight photodegradation, the parental compound 2-bromophenol decays much more slowly. The evolution of intermediate components, with emergence-decay evolution, is seen until the end of the monitored process time. End products are formed in a lower proportion than under UV light for the same time scale. For clarity, Fig. 4a and b shows the kinetic evolution of the components in the photodegradation process by displaying the variation of the peak area of the different resolved components as a function of the process time. The differences between the photodegradation rate under different light sources can be seen in the evolution of the parental compound, 2-bromophenol (1), which decays faster in UV light (in about 70–90 min) than in sunlight, where it takes about 200–230 min.

Table 4 shows the retention times of the peaks in UV and sunlight experiments (the number indicates the related components in Fig. 4). Upon comparing the retention times and the related resolved spectra of the two experiments, it can be seen that photodegradation under the two sources of light yields many similar components. As seen from Table 4, components 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 from UV light degradation have similar retention times and spectral profiles to the corresponding components from the sunlight experiment. Components found to be different in both photodegradations are usually very minor (8_{sun}, 9_{sun} in sunlight and 8_{uv} in UV) or may be simply not formed in a large enough extent under sunlight (9_{uv} and 10_{uv} from UV photodegradation). Also, the values of correlation coefficients obtained between the resolved spectra of the components from the two experiments (Table 4) supports the similarity between them and are found to be higher than 0.98 for almost all the similar components.

It is worth noticing that the chromatographic monitoring clearly showed high similarity in the kinetic evolution of some components and allowed for the detection and modeling of very minor photoproducts. These two factors help to understand why the number of contributions detected in the analysis of the sole spectroscopic monitoring experiments was lower. On one hand, compounds with very similar or identical kinetic evolution could not be distinguished. On the other hand, very minor compounds could not be modeled due to very little contribution to the global mixed signal of the spectra collected at different process times.

4.2.2. Analysis of HPLC–MS results for UV light and sunlight experiments

HPLC–MS data were structured in a multiset structure and pre-treated by compressing the dataset in the column direction to

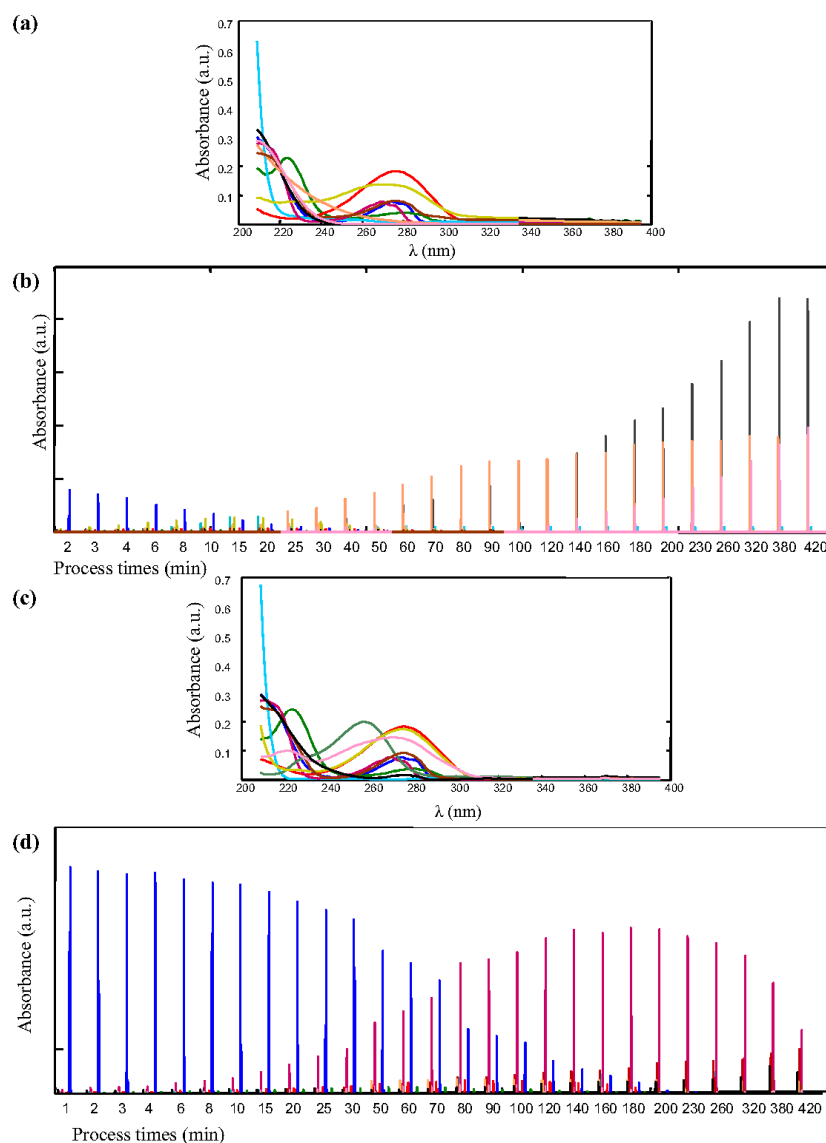


Fig. 3. MCR-ALS results of chromatographic monitoring of 2-bromophenol degradation under UV light (experiment D5). (a) Resolved elution profiles and (b) spectra. MCR-ALS results for experiment D7 (sunlight photodegradation). (c) Resolved elution profiles and (d) spectra.

remove the irrelevant m/z channels. Because of the lower number of components detected with HPLC–MS in this photodegradation system, a single multiset structure was analyzed.

The procedure for resolving HPLC–MS profiles was the same as for the HPLC–DAD multisets. The only difference was that the constraint of unimodality could not be applied, since isomers could provide more than one elution peak related to the same resolved MS spectrum. Table 5 shows the results from the

analysis of HPLC–MS data from UV light and sunlight experiments.

The variance explained in the analysis of HPLC–MS data is satisfactory, taking into account the higher noise level of this kind of measurement. The same number of contributions was detected under the two different sources of light. Increasing the concentration of the sample (Expts **DM6**, **DM8**) did not help in the detection of additional components. Three different contributions, i.e., three

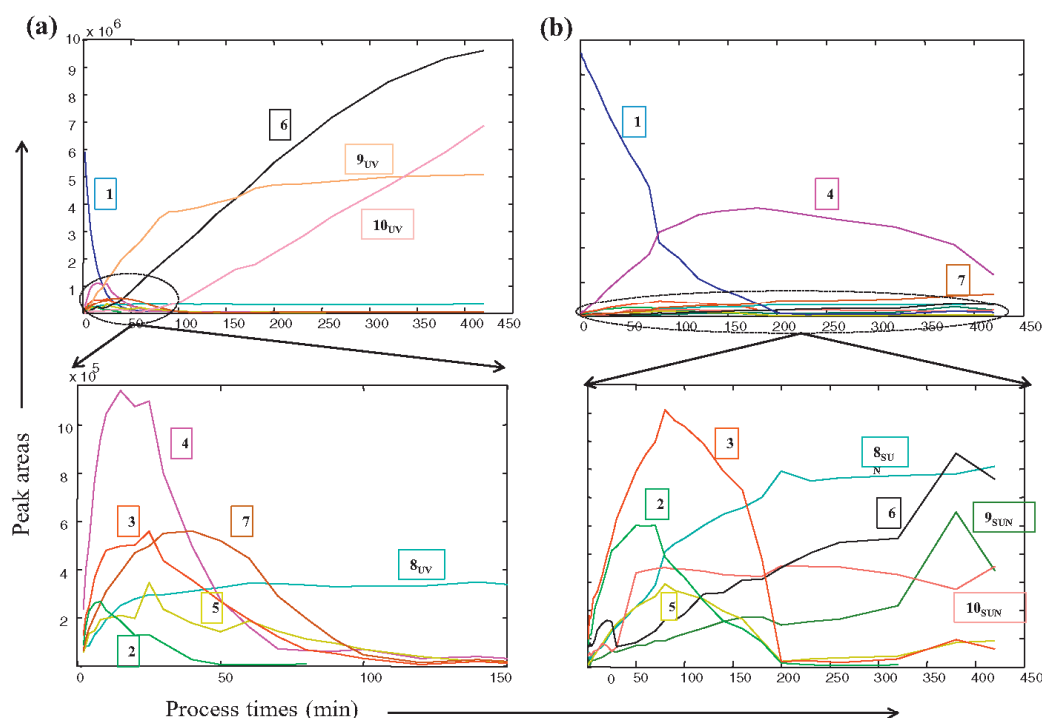


Fig. 4. Plots of peak areas of resolved components as a function of process time for the 2-bromophenol photodegradation. (a) Degradation under UV light (experiment DC5) and (b) degradation under sunlight (experiment DC7).

different MS spectral signatures, related to chemical compounds were detected in the HPLC–MS data.

The smaller number of contributions detected by HPLC–MS, as compared with HPLC–DAD, is due to the high noise level of the MS detection used that made infeasible the detection of some minor components and to the fact that homolog compounds share the same MS spectrum and are, therefore, modeled as a single contribution in the MCR–ALS results. The HPLC–MS results were used for identification purposes only, because the higher noise level prevented the resolution of minor peaks.

Since the ionization source in the MS detector used was the APCI in negative mode, the components are identified by the molecular weight of the deprotonated molecular ion $[M-H]^-$. With the knowledge of the molecular weight, some of the components

could be identified or, at least, assigned to potential components. The compound with $[M-H]^-$ value 109, could be resorcinol (3-hydroxyphenol), 4-hydroxyphenol, as identified by Lipczynska [7] or 2-hydroxyphenol, explained as formed by photohydrolysis [24]. It could also be attributed to cyclopentadienic acid, as reported by Guyon, formed due to the photocontraction by irradiation through a Wolff's rearrangement and hydrolysis, a reaction observed also in 2-chlorophenol [25]. All these compounds were found in previous studies that reported the debromination as a usual phenomenon in the photodegradation of 2-bromophenol. There were two homologous components having the same MS spectrum, with $[M-H]^-$ value at 171/173 and another peak at 79/81. These compounds were the parental 2-bromophenol, where the $[M-H]^-$ 171/173 corresponds to the molecular mass of 2-bromophenol and 79/81

Table 4

Retention times of peaks resolved in the 2-bromophenol degradation under UV light and sunlight (HPLC–DAD data).

UV light photodegradation (experiment D5)		Sunlight photodegradation (experiment D7)		Correlation coefficient, R^2
Component numbers	Retention times	Component numbers	Retention times	
1	8.74–8.8	1	8.608–8.792	1.0000
2	12.07–12.2	2	11.9–12.22	0.9913
3	6.89–6.94	3	6.725–6.842	0.9939
4	4.29–4.3	4	4.242–4.292	0.9998
5	3.84–3.857	5	3.808–3.858	0.9172
6	2.023–2.073	6	2.075	0.9884
7	2.907–2.923	7	2.892–2.925	0.9947
8 _{UV}	3.457–3.64	8 _{SU}	3.708–3.725	–
9 _{UV}	1.807–1.823	9 _{SU}	3.558–3.575	–
10 _{UV}	2.29–2.323	10 _{SU}	2.175–2.192	–

Please cite this article in press as: A. Jayaraman, et al., J. Chromatogr. B (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.038>

Table 5

Results from HPLC–MS, UV light and sunlight experiments.

Data matrix	Number of components	<i>m/z</i> values	Retention times (min)	<i>R</i> ²
UV light photodegradation experiment				
DM5	3(4 ^a)	171/173, 79/81 79/81 109	8.2–9.6, 11.5–13.2 1.6–2.4, 3.3–4.3 2.6–4.7	86.36
DM6	3	171/173, 79/81 79/81 109	8.2–9.6, 11.5–13.2 1.6–2.4, 3.3–4.3 2.6–4.7	94.67
Sunlight photodegradation experiment				
DM7	3(4 ^a)	171/173, 79/81 79/81 109	8.2–9.6, 11.5–13.2 3.3–4.3 2.6–4.7	93.07
DM8	3(4 ^a)	171/173, 79/81 79/81 109	8.2–9.6, 11.5–13.2 3.3–4.3 2.6–4.7	97.3

^a Background contribution had to be included as the fourth component in order to obtain a better resolution of the three chemical contributions in some data sets.

corresponds to the bromine isotopes, and 4-bromophenol, which can be formed by the bromine transfer phenomenon upon UV irradiation observed by Akai et al. [26]. Further evidence from previous studies performed in the research group confirmed also the presence of this compound [8]. The other two components with a smaller $[M-H]^-$ value at 79/81, found in the photodegradation under UV light, are also observed to be homologs. In the case of sunlight experiment, their presence is lower than for UV photodegradation, since those were the last photoproducts formed during the degradation process. These photoproducts could be identified as HBr or as small brominated aliphatic compounds, in agreement with the reported formation of HBr upon flash photolysis of bromophenols [24]. The assignments of the different compounds found are in agreement with a previous study [8].

The retention times of the components identified by HPLC–MS and HPLC–DAD also show similarities among the components identified with the two detection systems. Also, most of the components detected in the experiments under UV light were similar to those under sunlight. The missing compound in the sunlight degradation, related to *m/z* values 79/81, may be undetected because this is one of the last photoproducts formed in the UV photodegradation and may have not yet appeared at this process time under sunlight. Thus, the main effect of the different light sources on the photodegradation of 2-bromophenol is linked to the rate of the photodegradation process, but not to the identity of the photoproducts formed.

4.3. Spectroscopic/chromatographic coupling analysis

As an attempt to extract more information from the experimental data collected during the 2-bromophenol photodegradation under UV light, MCR-ALS was performed onto a multiset structure formed by spectroscopic and chromatographic information.

When this structure is analyzed by MCR-ALS, both potential ability to detect and model all the components and to define in detail the process evolution are kept. This is due to the simultaneous use of the uncorrelated chromatographic/elution information and the well-defined process time axis provided by the spectroscopic experiment.

In order to perform the combined spectroscopic/chromatographic data analysis, a column-wise augmented multiset structure is constructed with the spectroscopic monitoring experiment and some selected information from the chromatographic multiset. From the chromatographic multiset, only a few elution time windows most representative of the elution profiles of the different components are introduced to perform the combined MCR-ALS.

Fig. 5a shows the structure of the combined multiset formed by the spectroscopic data and the selected elution time windows of the chromatographic monitoring data.

D_{aug} represents the augmented data structure. D_{aug} is formed by S_p , which contains represents the spectroscopic monitoring data and T_w 's, which are the time windows selected from the chromatographic multiset. T_{w1} , T_{w2} and T_{w3} correspond to elution time windows 1, 2 and 3, where a single compound was eluting. For these so well defined components, only the time window related to the chromatographic run where these components are more dominant is included in the multiset structure. For time windows in which several components were coeluting, time windows from two chromatographic runs are included to have more information about these components in the resolution. These are the two sections labeled T_{w4} and T_{w5} in Fig. 5a. Before starting the MCR-ALS analysis, the different submatrices in the augmented matrix D_{aug} are scaled to minimize signal intensity differences in the multiset structure.

The initial estimates for this combined analysis were the resolved spectra from the chromatographic multiset. The constraints applied were non-negativity along spectral and concentration directions, unimodality along concentration direction, normalization along spectral direction and correspondence among the species. The correspondence among species plays an important role in this kind of analysis, since selectivity (in T_{w1} , T_{w2} and T_{w3}) and absence of many components (in T_{w4} and T_{w5}) can be set for the different elution time submatrices. For the spectroscopic experiment (S_p), all the species are considered to be present. The selectivity and local rank information from the chromatographic time windows provides a better quality to the final resolution results of the multiset structure and a drastic decrease of the rotational ambiguity, a common uncertainty phenomenon in MCR methods [11,27].

In this study, the combined analysis was performed for the spectroscopic data and the elution time windows of the chromatographic monitoring data from experiment DC5. Spectra collected every 30 s during the first 90 min of the experiment DC5 were used for the spectroscopic part of the combined analysis (S_p) since the parental 2-bromophenol and most other components in the process have emerged and decayed during this time range (see plot of peak area vs. process time in Fig. 4a). Taking only this period of time, the minor components evolving at the beginning of the process are also better represented.

Fig. 5b shows the resolved concentration and spectral profiles for the combined analysis. The variance explained was 99.02%, which was satisfactory and confirmed the good description of the multiset structure by the MCR-ALS model. In this case, 8 out of

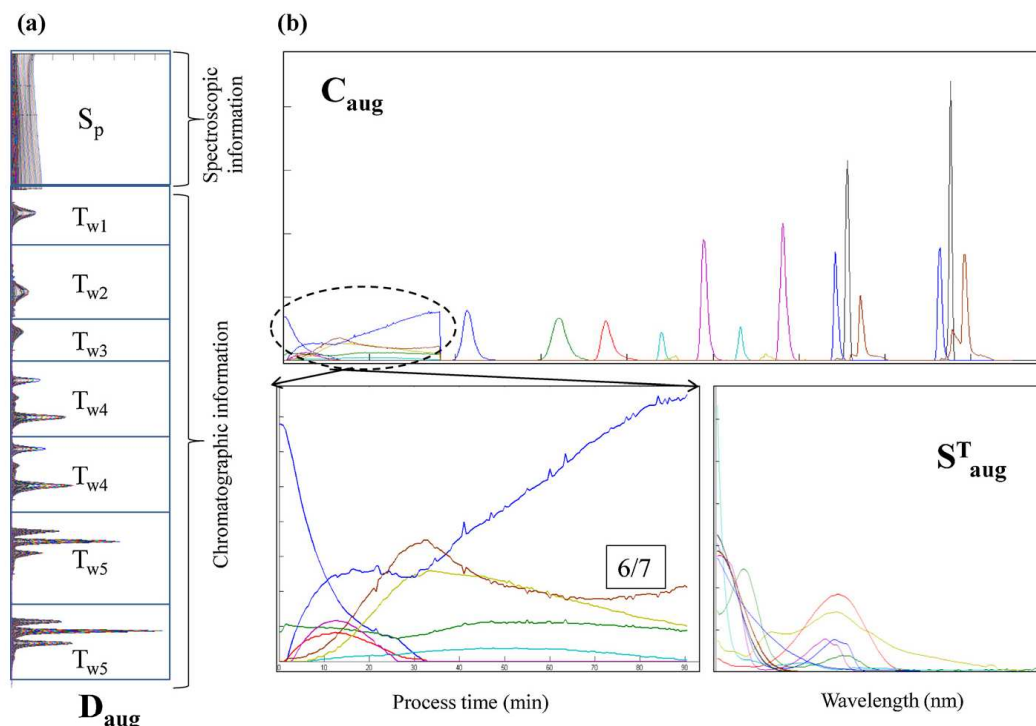


Fig. 5. Analysis of spectroscopic/chromatographic multiset linked to 2-bromophenol photodegradation under UV light. (a) Multiset structure (see text for meaning of D_{aug} submatrices). (b) Resolved concentration and spectral profiles of coupling analysis (kinetic profiles of spectroscopic monitoring have been zoomed in for a better view).

the 10 components resolved chromatographically provided acceptable concentration profiles in the spectroscopic experiment, with shapes in agreement with those observed in the peak area vs. process time plot (in Fig. 4a). Only a very minor compound co-eluting in T_{w4} was not detected and the components colored in brown and black in Fig. 5b appeared as a single profile (brown) in the spectroscopic experiment. This last problem is due to the high similarity in the kinetic and spectral profiles for these components and to the fact that both co-elute in the chromatographic window. Nevertheless, the description of the kinetic evolution in the spectroscopic experiment is much better than the results obtained when this experiment was analyzed alone.

From the kinetic profiles obtained, it can be concluded that 2-bromophenol photodegradation takes place through a complex process, where the kinetic evolution of many components is very similar. This can suggest the presence of many parallel or second- or higher order reactions. At this point, no more detail on the mechanism can be provided since not all the components could be identified and, therefore, there is a lack of knowledge about the underlying chemistry behind this photodegradation process. For processes with a slightly smaller number of components involved and a deeper knowledge of the underlying chemistry, the multiset structure presented would have allowed the postulation of a kinetic model for the spectroscopic experiment (introduced as an additional constraint) [28].

For the process presented, there would be a massive number of possible models that could fit the data and there are no sufficient sound chemical reasons to choose one of them over the rest.

Therefore, the soft-modeling chromatographic/spectroscopic data analysis is the alternative that can provide the most reliable results.

5. Conclusions

The differences of using UV or sunlight for the 2-bromophenol photodegradation were shown to be mainly on the rate of the photodegradation, whereas both light sources yielded similar photoproducts among which hydroxyphenol, 4-bromophenol, were identified.

As general conclusions on the monitoring of photodegradation processes, it has been shown that spectroscopic experiments allow for a good description of the mechanism and evolution of processes because of the detailed monitoring in time. However, the number of process contributions can be underestimated when components with identical or very similar spectra and/or kinetic evolution exist. Chromatographic monitoring coupled with MCR-ALS is a good strategy to distinguish components with similar kinetic evolution and similar spectra because of their differences in elution pattern. It can also detect minor components because their signals are not mixed with the rest of the components. The only drawback in the chromatographic monitoring is the poorly defined process time axis because of the limited number of chromatograms linked to the process. The combined analysis of spectroscopic and chromatographic monitoring data sets by MCR-ALS provides a more detailed description of the kinetic evolution of the process due to the good description of the process time axis in the spectroscopic data set and to the distinct information among components incorporated

from the chromatographic data. Only in very complex processes with a large number of compounds, a few contributions may be missed if some compounds are very minor or if they are similar in kinetic, spectral and elution behaviors. For processes with a low number of compounds or with a well known chemistry, it is possible to incorporate kinetic models to fit the concentration profiles in the spectroscopic monitoring experiment. In these cases, a full description of the process mechanism and products formed is possible.

Acknowledgments

We acknowledge funding from the Spanish government (grant CTQ2009-11572 and CTM2008-03263/TECNO). The authors of this work belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2009 SGR 45). We also acknowledge a M. Sci. grant for A. Jayaraman and the additional funding from the European Union for the Erasmus Mundus 2009–2013 scheme.

References

- [1] C.A. de Wit, *Chemosphere* 46 (2002) 583.
- [2] M. Uchida, M. Furusawa, A. Okuwaki, *J. Hazard. Mater.* 101 (2003) 231.
- [3] <http://toxnet.nlm.nih.gov/>, Hazardous Substances Databank (Number: 7648), Toxicology Data Network (last updated: 26-06-2009).
- [4] Y. Ku, R.M. Leu, K.C. Lee, *Water Res.* 30 (1996) 2569.
- [5] J. Klánová, P. Klán, J. Nosek, I. Holoubek, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1568.
- [6] K.H. Wang, Y.H. Hsieh, K.S. Huang, *J. Chin. Inst. Environ. Eng.* 4 (1994) 111.
- [7] E. Lipczynska-Kochany, *Chemosphere* 24 (1992) 911.
- [8] S. Mas, A. Carbó, S. Lacorte, A. de Juan, R. Tauler, *Talanta* 83 (2010) 1134.
- [9] A. de Juan, R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163.
- [10] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
- [11] R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [12] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 123.
- [13] M. De Luca, S. Mas, G. Ioele, F. Oliverio, G. Ragno, R. Tauler, *Int. J. Pharm.* 386 (2010) 99.
- [14] S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 18.
- [15] P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens, in: *Biosystems Data Analysis Group*, Amsterdam, 2005, http://www.science.uva.nl/~hboelens/publications/draftpub/Eilers_2005.pdf.
- [16] S.C. Rutan, A. de Juan, R. Tauler, in: S.D. Brown, R. Tauler, B.W. (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 249.
- [17] G.H. Golub, C.F.v.V. Loan, *Matrix Computations*, The John Hopkins University Press, London, 1989.
- [18] W. Windig, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 16 (1992) 1.
- [19] H. Abdollahi, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 108 (2011) 100.
- [20] A. de Juan, Y. Vander Heyden, R. Tauler, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 307.
- [21] R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Elsevier, Amsterdam*, vol. 2, 2009, p. 473.
- [22] J. Andraos, *Can. J. Chem.* 77 (1999) 565.
- [23] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, A. Izquierdo-Ridors, *J. Chemom.* 12 (1998) 183.
- [24] H.I. Joschek, S.I. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3269.
- [25] C. Guyon, P. Boule, J. Lemaire, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 1581.
- [26] N. Akai, S. Kudoh, M. Takayanagi, M. Nakata, *Chem. Phys. Lett.* 363 (2002) 591.
- [27] R. Tauler, M. Maeder, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Elsevier, Amsterdam*, vol. 2, 2009, p. 345.
- [28] S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9260.

5.3.1. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Tal com s'ha esmentat en el capítol d'introducció, existeixen pocs estudis publicats sobre la fotodegradació dels bromofenols. A més, aquests estudis es focalitzen principalment en la fotodegradació dels congèneres monobromats sota radiació UV. Aquests estudis semblen indicar que la degradació dels bromofenols mitjançant la llum és un procés molt complex. En la bibliografia es descriu una àmplia varietat de reaccions possibles, que donen lloc a una variada gamma de productes que poden ser tan o més nocius que els propis bromofenols. D'aquí ve la importància del coneixement de la fotoquímica d'aquests compostos.

Atenent aquest fet, s'ha estudiat la fotodegradació de sis bromofenols amb diferent grau de bromació (2-bromofenol (2BP), 3-bromofenol (3BP), 4-bromofenol (4BP), 2,4-dibromofenol (24DBP), 2,4,6-tribromofenol (246TBP) i pentabromofenol (PBP)) mitjançant la metodologia experimental i quimiomètrica proposada en la secció 5.1.1.2. També s'ha volgut avaluar l'efecte de diferents fonts de radiació sobre el mecanisme del procés i els fotoproductes formats. Amb aquesta finalitat s'ha estudiat el procés de fotodegradació del 2-bromofenol mitjançant radiació UV i radiació solar simulada.

En resum, els objectius generals d'aquest bloc són:

- ✓ Estudi i interpretació del procés de fotodegradació de bromofenols amb diferent grau de bromació i sota fonts de radiació diferent.
- ✓ Avaluació d'aquests dos factors en la cinètica i la natura dels fotoproductes formats.

A continuació es presenta una discussió dels resultats obtinguts a partir de les diferents tècniques instrumentals (espectroscòpia i cromatografia) per separat i acoblades seguint la metodologia proposada en aquesta tesi.

5.3.1.1. SEGUIMENT CINÈTIC PER ABSORCIÓ MOLECULAR

Per a veure l'efecte del grau de bromació en el procés de fotodegradació es va fer una primera anàlisi exploratòria de les degradacions dels sis bromofenols mitjançant MCR-ALS i HS-MCR.

A partir de la resolució amb MCR-ALS es va poder suggerir el model cinètic:

$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$ per als processos de fotodegradació dels monobromofenols, del 24DBP i del 246TBP (vegeu Figura 2a a l'article 5.3-I per a l'exemple del 2BP) i $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D \xrightarrow{k_4} E$ per a la fotodegradació del PBP. Un nombre menor o superior de contribucions no donava resultats satisfactoris.

L'anàlisi de les dades amb HS-MCR, forçant els perfils de concentració a seguir els models cinètics anteriorment esmentats, va presentar un bon ajust de les dades, molt similar a l'obtingut amb MCR-ALS. En tots dos casos el percentatge de variància explicada va ser superior al 99 %. D'aquesta manera es confirmen els models cinètics proposats a partir de la resolució de les dades amb MCR-ALS i s'obtenen les constants de fotodegradació que es recullen en la taula 5.3-1.

Taula 5.3-1. Resultats de la resolució de les matrius individuals dels sis bromofenols mitjançant MCR-ALS i HS-MCR.

Bromofenols	Mètode d'anàlisi	% LOF*	Paràmetres cinètics, k_i ($\times 10 \text{ min}^{-1}$) ⁺
2BP	MCR-ALS	2,21	----
	HS-MCR	1,07	$k_1 = 1,76; k_2 = 1,74; k_3 = 1,03$
3BP	MCR-ALS	1,23	----
	HS-MCR	1,15	$k_1 = 1,53; k_2 = 1,2; k_3 = 0,54$
4BP	MCR-ALS	1,31	----
	HS-MCR	5,78	$k_1 = 14,46; k_2 = 24,24; k_3 = 0,46$
24DBP	MCR-ALS	1,34	----
	HS-MCR	6,91	$k_1 = 3,5; k_2 = 0,92; k_3 = 0,81$
246TBP	MCR-ALS	1,05	----
	HS-MCR	6,80	$k_1 = 3,73; k_2 = 0,94; k_3 = 0,78$
PBP	MCR-ALS	1,10	----
	HS-MCR	2,32	$k_1 = 4,08; k_2 = 1,44; k_3 = 1,01; k_4 = 0,91$

* % LOF: manca d'ajust del model (%) + Els valors han estat arrodonits d'acord amb el seu error associat

A partir dels valors de les constants obtingudes es pot observar que la posició del brom influeix significativament en la cinètica de degradació. El monobromofenol amb el brom amb posició para presenta la major velocitat de degradació. A més, també s'observa un petit augment de la velocitat de degradació quan el nombre de broms és major. Aquests resultats són consistents amb els trobats a la bibliografia per als clorofenols, compostos anàlegs dels bromofenols[Burrows, 1998].

Cal remarcar que tot i que només han calgut de 4 a 5 contribucions per a modelar l'evolució cinètica de la fotodegradació de cadascun dels bromofenols, el nombre d'espècies químiques formades durant el procés pot ser superior. Això pot passar si es tenen espècies amb una evolució cinètica idèntica, amb espectres purs molt semblants o si són molt minoritàries, tal i com ja s'indicava en la secció 5.1.1.2. En aquests cas, les constants cinètiques obtingudes a partir de l'experiment espectroscòpic s'han d'interpretar com a constants cinètiques aparents.

5.3.1.2. SEGUIMENT CINÈTIC PER CROMATOGRAFIA AMB DETECCIÓ DAD-MS.

En aquest cas, per a estudiar l'efecte del grau de bromació en el procés de fotodegradació dels bromofenols, per a cada experiment es realitza l'anàlisi simultània de tots els cromatogrames recollits als diferents temps de procés mitjançant MCR-ALS.

A partir del dibuix dels cromatogrames mitjans obtinguts per a cadascun dels bromofenols (vegeu Figura 5.3-1) es pot observar que el nombre de compostos detectats visualment supera les contribucions modelades en els experiments de seguiment cinètic per espectroscòpia. Això confirma la complexitat dels sistemes i la possibilitat que molts productes de fotodegradació evolucionin de manera molt similar des del punt de vista cinètic o presentin un espectre molt similar i que, per tant, no hagin pogut ser resolts en els experiments de seguiment cinètic per espectroscòpia.

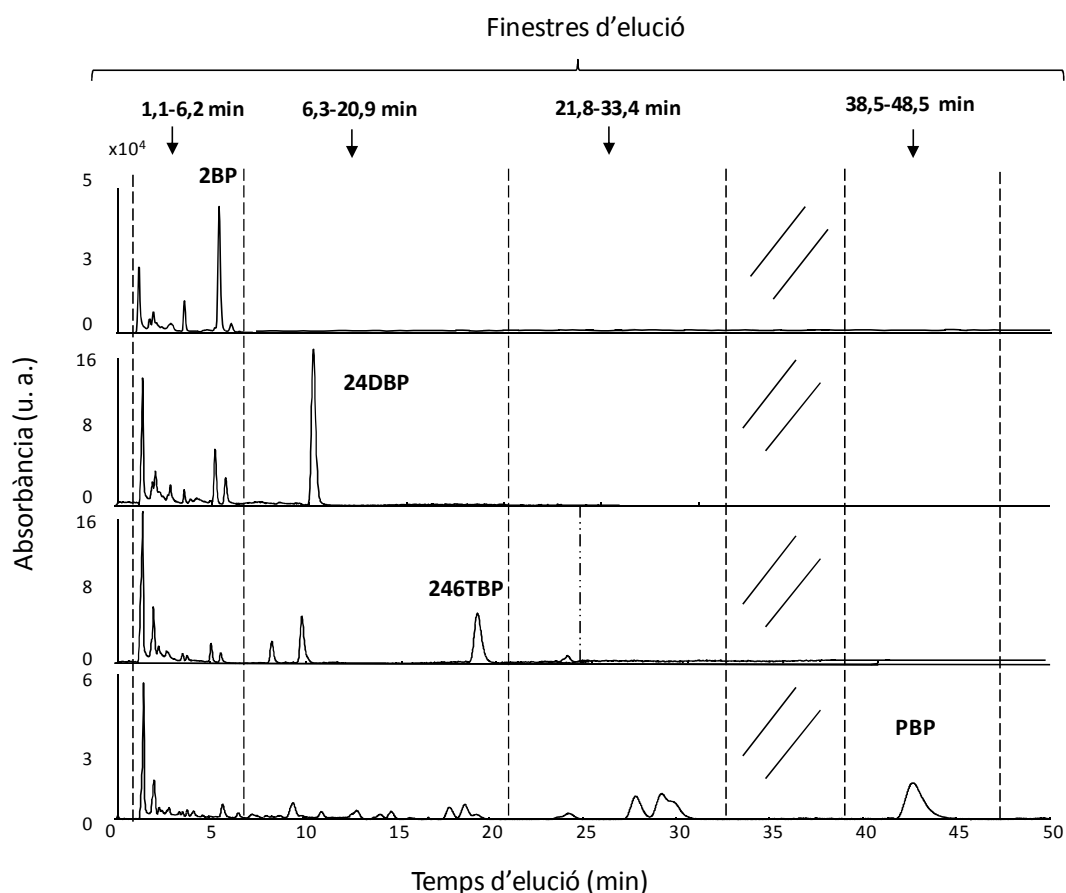


Figura 5.3-1. Cromatogrames mitjans d'alguns dels bromofenols estudiats. Les línies defineixen les finestres d'elució utilitzades en les anàlisi MCR-ALS.

Degut al gran nombre de compostos que presenten aquests sistemes, es van construir diverses matrius augmentades, una per a cada finestra d'elució (*elution time-windowing*) mostrada en la Figura 5.3-1 i es van analitzar per separat. Aquesta estratègia redueix la mida i la complexitat de les estructures de les matrius augmentades i també proporciona una resolució més fàcil dels components involucrats en el sistema.

En fer una inspecció preliminar de les dades obtingudes amb els detectors de DAD i MS, s'observa que les mesures obtingudes amb detecció MS presenten

molt més soroll de fons que les procedents del detector DAD (vegeu Figura 5.3-2).

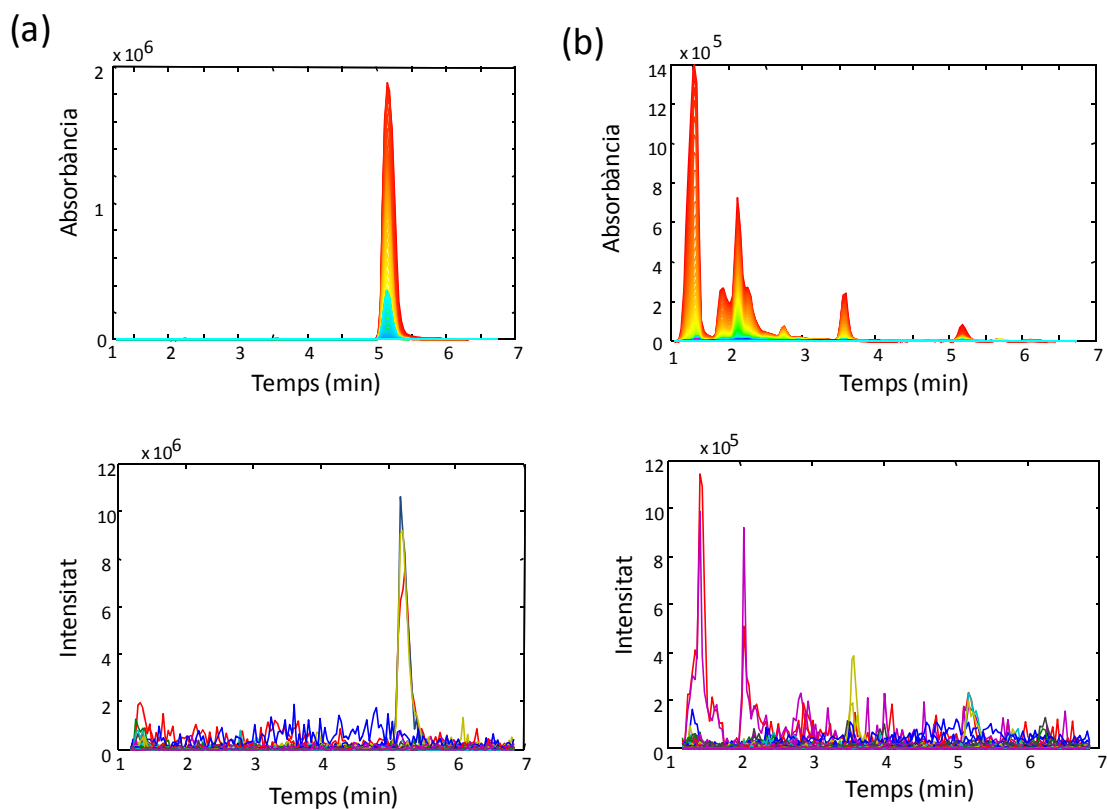


Figura 5.3-2. Cromatogrames obtinguts amb detecció DAD i MS recollits en la primera alíquota (a) i en l'última alíquota (b) del procés de degradació del 2-bromofenol.

A mode de resum, la taula 5.3-2 mostra el nombre de components modelats en l'anàlisi de les dades de HPLC-DAD i de HPLC-MS mitjançant MCR-ALS per a tots els bromofenols estudiats i per a les diferents fonts de radiació.

Taula 5.3-2. Nombre de components modelats i variància explicada en la resolució dels experiments cromatogràfics de fotodegradació dels bromofenols en funció del diferent grau de bromació i de les fonts de radiació emprades.

Experiments amb llum UV				
Bromofenols	HPLC-DAD		HPLC-MS	
	N. de components	$R^2(\%)^*$	N. de components	$R^2(\%)^*$
2BP	9	98,6	6	70,4
2BP[#]				
1,2-3,2 min.	4	97,8	3 ⁺ (4)	86,4
3,2-4,7 min.	3	96,3		
6,6-7,7 min.	1	95,6		
8,2-9,9 min.	1	99,9		
11,6-12,7 min.	1	90,2		
3BP	7	96,5	6	72,6
4BP	7	97,8	6	79,8
24DBP				
1.1-6.2 min.	10	96,1	6 ⁺ (8)	95,8
6.3-12 min.	2	99,9	1	94,1
246TBP				
1.1-6.2 min.	9	97,5	7 ⁺ (9)	96,7
6.3-22.0 min.	6	99,9	4 ⁺ (5)	98,8
PBP				
1.1-6.2 min.	11	96,7	7 ⁺ (9)	98,7
6.3-20.9 min.	15	97,7	7 ⁺ (8)	90,8
21.8-33.4 min.	6	97,8	4 ⁺ (7)	95,8
38.5-48.5 min.	2	99,9	1	92,2
Experiments amb el simulador de llum solar				
Bromofenols	HPLC-DAD		HPLC-MS	
	N. de components	$R^2(\%)^*$	N. de components	$R^2(\%)^*$
2BP[#]				
1,0-3,3 min.	3	90,9	3+(4)	93,7
3,3-4,7 min.	4	99,9		
6,4-7,4 min.	1	93,9		
7,9-9,6 min.	1	99,9		
11,4-12,7 min.	1	96,4		

+ Nombre d'espècies químiques (entre parèntesis nombre total de components de l'anàlisi: compostos químics + contribucions de soroll de fons/línia de base).

* Variància explicada

Aquests experiments pertanyen a l'article 5.3-II i s'han realitzat en una fase mòvil diferent a la resta (vegeu l'article per més detall).

En tots els casos es pot observar que a partir de les dades de HPLC-MS s'aconsegueixen modelar menys components que amb l'anàlisi de les dades de HPLC-DAD. Aquest fet té diferents causes possibles. En primer lloc, l'augment del soroll de fons en HPLC-MS, que dificulta molt la detecció d'espècies minoritàries. A més, els espectres de masses de congèneres del mateix grau de bromació o de fotoproductes isòmers són idèntics i, per tant, no es comptabilitzen com a components diferents en l'anàlisi de resolució.

Aquest és un sistema en què és difícil fer una bona correspondència d'espècies entre els resultats obtinguts pels dos sistemes de detecció (DAD i MS) i, per tant, no es va procedir a l'anàlisi de l'acoblament HPLC-DAD-MS. Es presentaran, doncs, separatament l'anàlisi de les dades HPLC-DAD, que permetrà modelar totes les espècies involucrades en el sistema i donarà una idea sobre l'evolució cinètica dels productes de degradació, i l'anàlisi de les dades HPLC-MS, que permetrà la caracterització i la possible identificació dels productes de fotodegradació.

ANÀLISI DE DADES DE HPLC-DAD

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'anàlisi dels experiments de fotodegradació a partir dels seguiment cromatogràfic es realitza mitjançant la resolució amb MCR-ALS de la matriu augmentada que conté tots els cromatogrames obtinguts en els diferents temps de procés. Les restriccions aplicades han estat no negativitat (a la matriu \mathbf{S}^T i la matriu \mathbf{C}), unimodalitat en la direcció de les concentracions, selectivitat i la restricció de correspondència d'espècies. La Figura 5.3-3 mostra, com a exemple, la resolució de les dades corresponents al procés de fotodegradació del 2-bromofenol sota llum UV. En la figura 5.3-3-a es mostren els perfils d'elució resolts de la matriu

augmentada, en els quals es pot observar com el mètode MCR-ALS presenta una gran eficàcia per a resoldre coelucions fortes i espècies minoritàries. En la Figura 5.3-3-b es pot observar que moltes espècies resoltes mostren una gran semblança espectral. A més, en representar l'àrea de pic dels diferents components en funció dels temps de procés analitzats, també es comprova que algunes espècies segueixen una evolució cinètica molt semblant (Figura 5.3-3-c). Tot això explica que el nombre d'espècies modelades en l'experiment per seguiment espectroscòpic fos menor. El fet de determinar un major nombre d'espècies cromatogràficament que espectroscòpicament, que els espectres dels compostos resolts s'assemblin i que l'evolució cinètica entre molts d'ells sigui similar és una conclusió general que s'aplica a tots els bromofenols estudiats.

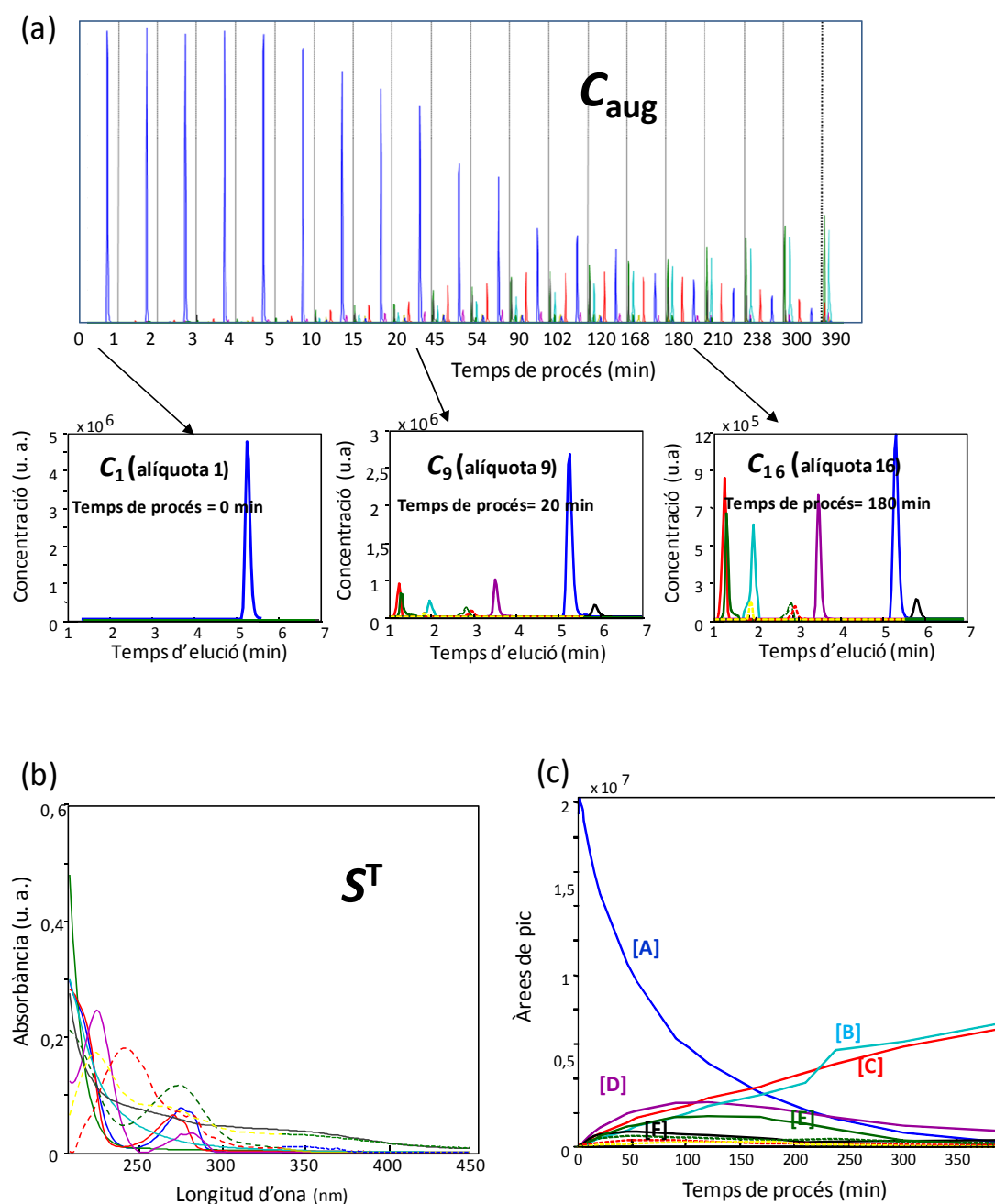


Figura 5.3-3. Resolució de les dades del seguiment cromatogràfic del procés de fotodegradació del 2-bromofenol. (a) Perfils d'elució resolts (C_{aug}), (b) perfils espectrals resolts (S^T) i (c) representació de les àrees dels pics resolts en funció del temps de procés.

L'efecte del grau de bromació en el procés de fotodegradació es pot estudiar des de dos punts de vista: la identitat dels productes obtinguts i l'evolució

cinètica dels processos. Una primera conclusió esperada és que el nombre de productes de degradació augmenta en fer-ho el grau de bromació (vegeu també Taula 5.3-2). Si s'accepta la hipòtesi que la desbromació és un dels processos lligats a la fotodegradació, cada bromofenol proporciona els productes de degradació que li són propis més els que provenen de bromofenols amb menor grau de bromació. Pel que fa a la natura dels productes de degradació, se sap que la identitat d'un compost analitzat per HPLC-DAD ve definida pel seu temps de retenció i la forma del seu espectre UV. En comparar les formes espectrals dels productes de fotodegradació dels diferents bromofenols en la mateixa finestra d'elució, es comprova que molts fotoproductes són comuns i només alguns presenten espectres diferents, lligats a la fotodegradació d'algun bromofenol específicament. Això es confirmarà amb els resultats de HPLC-MS.

L'evolució cinètica dels processos de fotodegradació seguits cromatogràficament es pot interpretar fàcilment representant les àrees dels pics resolts en funció del temps de procés. La Figura 5.3-4 mostra aquestes representacions per als tres monobromofenols (Figura 5.3-4-a), per al 24DBP (Figura 5.3-4-b), per al 246TBP (Figura 5.3-4-c) i per al PBP (Figura 5.3-4-d) on s'han etiquetat i acolorit de la mateixa manera els grups de compostos que sembla que presentin el mateix comportament cinètic. El compost parental de les degradacions apareix amb traç més gruixut i de color negre.

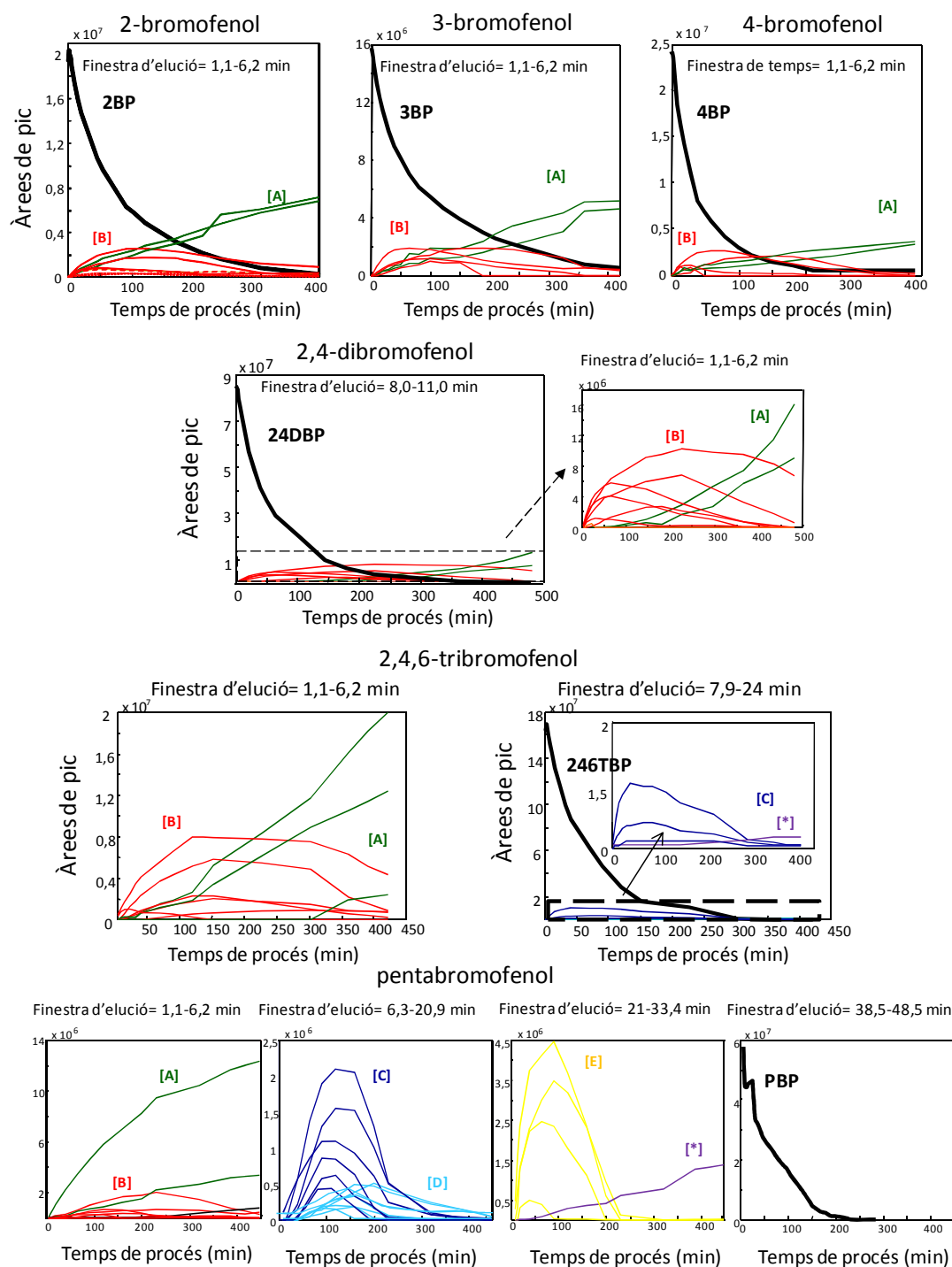


Figura 5.3-4. Àrees de pics resultats en funció del temps de procés (perfils cinètics) per a cadascun dels bromofenols estudiats a les diferents finestres d'elució. [*] correspon a producte no identificat.

Cal remarcar que en tots els processos la seqüència de l'aparició de compostos en el procés cinètic sembla ser inversa a la seva seqüència d'elució. D'aquesta manera, aquells compostos que augmenten de forma contínua fins al final del procés ([A]) tendeixen a aparèixer a la primera finestra d'elució i les petites diferències de temps en l'aparició de grups d'intermedis ([B], [C], [D] i [E]) mostren la mateixa tendència temporal. Aquest comportament sembla consistent amb la desbromació gradual d'aquests compostos sota l'acció de la llum, ja que compostos menys pesants (menys bromats) haurien d'eluir abans amb el sistema cromatogràfic utilitzat.

Sabent que els grups de bromofenols homòlegs (amb el mateix grau de bromació) apareixen en la mateixa finestra d'elució a causa de que presenten patrons d'elució similars i tenint com a referència els temps de retenció dels compostos parentals (vegeu Figura 5.3-1), podem postular que en la finestra d'elució de 1,1-6,2 minuts podrien aparèixer els congèneres de monobromofenols i els seus corresponents fotoproductes, la finestra d'elució de 6,3-20,9 minuts podria estar relacionada amb els dibromofenols, tribromofenols i altres fotoproductes i la finestra d'elució de 21,8-33,4 minuts correspondria als tetrabromofenols i pentabromofenol. Per tant, sembla que la identificació i seqüència [A], [B], [C], [D] i [E] de la Figura 5.3-4 correspondria a famílies de compostos que van augmentant el nombre de broms en la seva estructura. Caldrà, però, l'anàlisi de les dades de HPLC-MS per tal de confirmar aquests postulats.

Com evidència relacionada amb el comportament cinètic, es comprova que els perfils cinètics de la Figura 5.3-4 suggereixen mecanismes de reaccions paral·leles, de segon ordre o d'ordre superior, que difereixen molt de

l'esquema reaccional proposat amb els experiments del seguiment per espectroscòpia.

Les àrees dels pics resolts dels compostos parentals en funció del temps de procés es van ajustar mitjançant l'algoritme no lineal Newton–Gauss–Levenberg/Marquardt (NGL/M) [Maeder, 1990] per tal d'estimar la constant de degradació aparent de cadascun dels bromofenols (vegeu Figura 5.3-5).

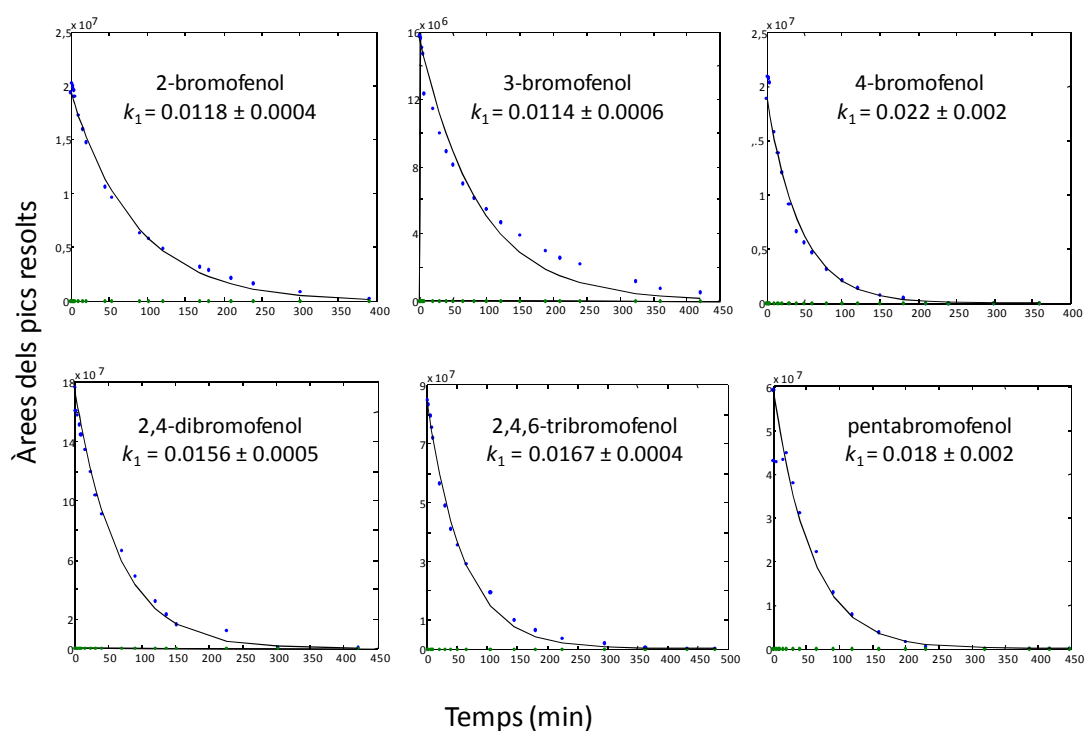


Figura 5.3-5. Ajust de les àrees dels pics resolts dels compostos parentals en funció del temps de procés. Valor de les constants estimades amb els seus errors associats.

Aquestes constants confirmen el comportament observat amb els experiments espectroscòpics. És a dir, s'observa que la posició del brom influeix significativament en la cinètica de degradació, ja que el monobromofenol amb el brom en posició para presenta la major velocitat de degradació. A més

també s'observa un petit augment de la velocitat de degradació quan el nombre de broms en l'estructura del bromofenol és més gran.

Per a fer l'estudi de l'efecte de la llum en el procés de fotodegradació es va utilitzar com a exemple la degradació del 2-bromofenol. En la Figura 5.3-6 es mostren els resultats de la resolució de les dades corresponents al procés de fotodegradació del 2-bromofenol emprant llum UV i emprant el simulador de llum solar (vegeu la secció 3.1.1 per a les característiques de les dues fonts de radiació). En observar l'evolució dels pics cromatogràfics resolts en funció del temps de procés, es pot constatar que la degradació del bromofenol sota la llum UV (pic blau fosc) és més ràpida, que sorgeixen moltes espècies intermèdies que arriben a desaparèixer completament i es detecta algun compost que augmenta la seva proporció fins al final del procés. En el cas de la fotodegradació sota llum solar simulada, la intensitat del 2-bromofenol decau molt més lentament i l'evolució d'emergència i desaparició dels components intermedis és sovint incompleta durant el temps dels procés controlat. Aquesta tendència es veu amb més claredat amb la representació de les àrees de pic en funció del temps de procés (Figures 4a i 4b de l'article 5.3-II).

En comparar els temps de retenció i els espectres relacionats dels compostos resolts amb els dos experiments (Taula 4 de l'article 5.3-II i Figures 5.3-6-a i c), es pot observar que la fotodegradació mitjançant les dues fonts de radiació produeix molts compostos idèntics.

Per tant, sembla que el principal efecte de les diferents fonts de llum sobre la fotodegradació de 2-bromofenol està vinculat a la velocitat del procés de fotodegradació, però no a la identitat dels seus fotoproductes.

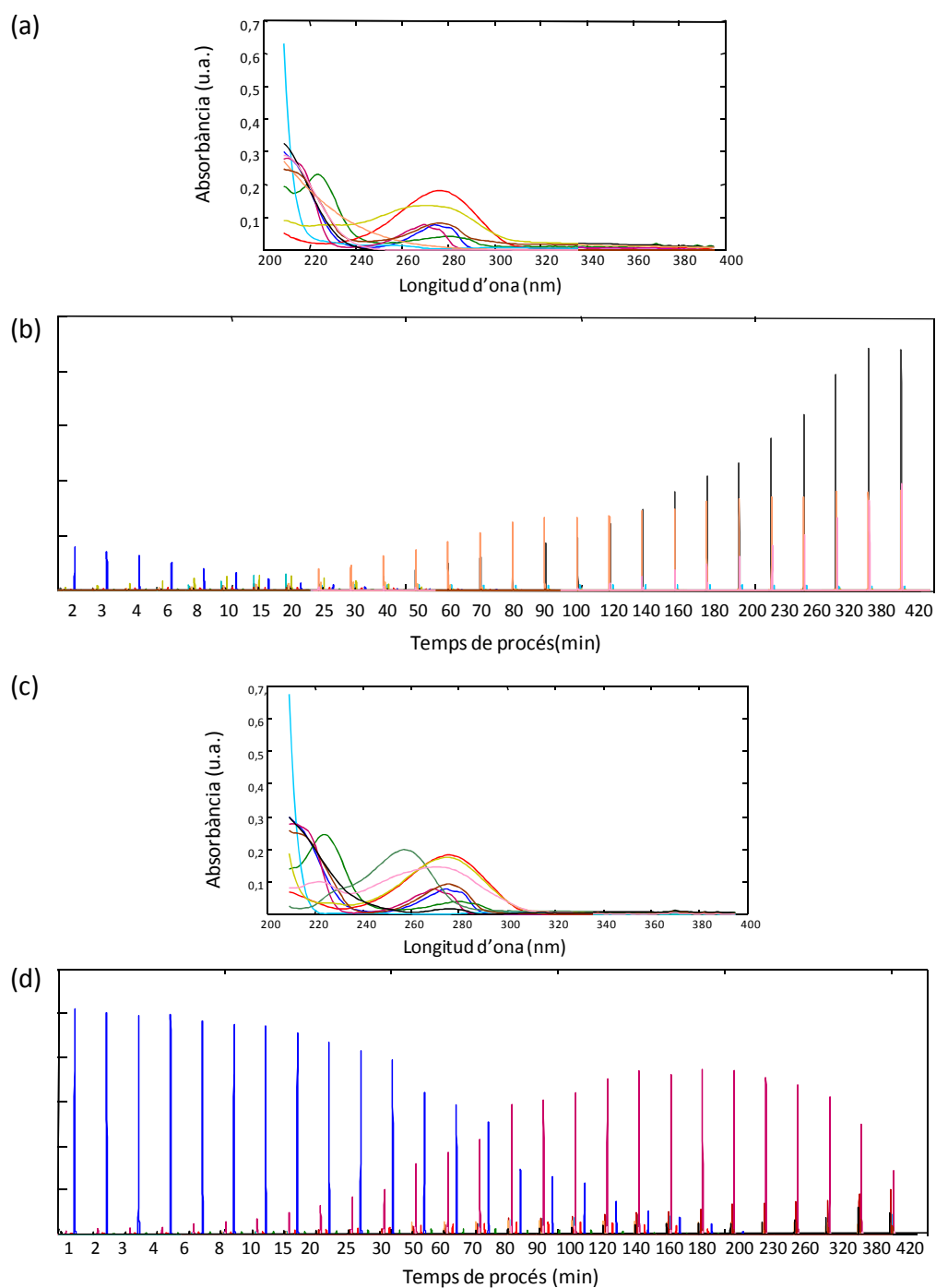


Figura 5.3-6. Resolució de les dades del seguiment cromatogràfic del procés de fotodegradació del 2-bromofenol sota diferents fonts de radiació. (a) Perfils espectrals i (b) perfils d'elució resolts emprant llum UV. (c) Perfils espectrals i (d) perfils d'elució resolts emprant el simulador de llum solar.

ANÀLISI DE DADES DE HPLC-MS

L'anàlisi de les dades de HPLC-MS permetrà identificar i caracteritzar els productes de fotodegradació. En la resolució d'aquestes dades, es procedeix de la mateixa manera que amb les dades obtingudes amb la detecció DAD, però sense aplicar la restricció d'unimodalitat en alguns perfils d'elució. Això és causa de que alguns congèneres poden presentar diferent comportament d'elució (pics cromatogràfics diferents) però el mateix espectre de masses. Per tant, a tots aquests congèneres se'ls associa un únic perfil d'elució multimodal. A més, per a la resolució d'aquestes dades s'afegeix el preprocessat de compressió en la direcció espectral, descrit a la secció 4.3.1. D'aquesta manera, només es mantenen els canals espectrals corresponents a relacions m/z per a les quals la intensitat supera el 0,8-2 % del canal de màxima intensitat de la matriu augmentada. Realitzant aquesta compressió, es passa dels 580 canals espectrals originals a un interval d'entre 90 i 190 canals, sense perdre informació química i s'eliminen molts canals associats únicament a soroll experimental.

Així doncs, després de la compressió s'obté una matriu \mathbf{D}_{comp} , que conté la informació rellevant de la matriu augmentada original (\mathbf{D}). En aquest cas, en resoldre la matriu \mathbf{D}_{comp} s'obté:

$$\mathbf{D}_{\text{comp}} = \mathbf{C}(\mathbf{S}_{\text{comp}}^T) \quad \text{Equació 5.3.1}$$

Per tant, la matriu \mathbf{C} ja és directament la matriu de perfils de concentració. Per a recuperar la matriu \mathbf{S}^T (espectres de masses purs complets) s'aplica un únic pas de regressió per mínims quadrats no negatius (vegeu Figura 5.3-6)

utilitzant els perfils de concentració obtinguts i la matriu original amb els espectres de masses complets (D):

$$S^T = C^+ D \quad \text{Equació 5.3.2}$$

on C^+ és la pseudoinversa de la matriu C .

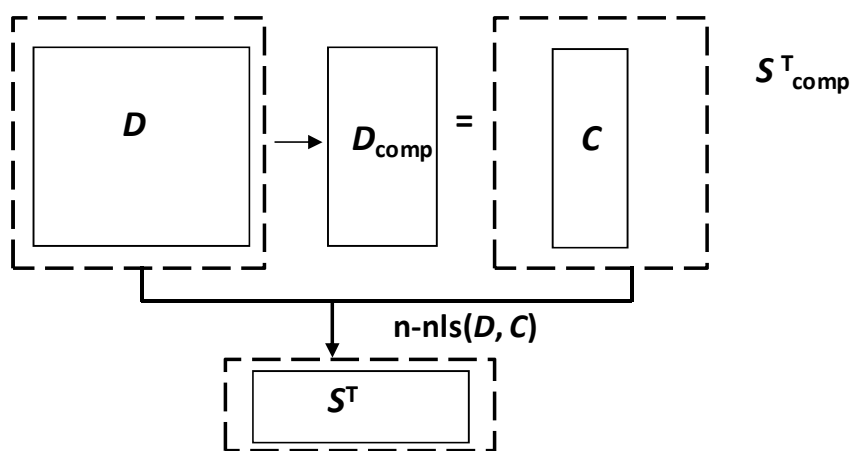


Figura 5.3-6. Compresió de dades i recuperació dels espectres mitjançant regressió per mínims quadrats no negatius

A partir dels espectres de masses resolts, dels temps de retenció dels compostos i de la bibliografia [Durand, 1998; Joschek, 1966; Lipczynskakochany, 1992; Bonnichon, 2001; Akai, 2002] s'han intentat caracteritzar els productes de fotodegradació.

En la bibliografia es proposen diversos productes derivats de la fotodegradació dels monobromofenols, tal i com s'ha comentat en la secció 2.2.1.2. Pel que fa als bromofenols amb un major nombre de broms, existeixen pocs estudis

referents a la seva fotodegradació i només per a la fotodegradació del 2,4-dibromofenol se'n proposen algunes estructures dels fotoproductes [Durand, 1998; Joschek, 1966; Lipczynskakochany, 1992; Bonnichon, 2001; Akai, 2002]. També s'han consultat articles que parlen sobre clorofenols, a causa de que tenen característiques semblants i es podrien esperar productes de fotodegradació anàlegs [Rayne, 2009; Burrows, 1998].

Atesa la controvèrsia entre les propostes d'identitat de fotoproductes trobades a la bibliografia i partint del fet que és difícil proposar una única estructura vàlida per a un cert compost, s'han intentat caracteritzar aquells compostos que es modelen amb més sovint i tenen un espectre de masses més ben definit. En la taula 3 de l'article 5.3-I es proposa la identitat de més de trenta fotoproductes i es descriu de quin compost parental procedeixen.

Per als monobromofenols es van postular la formació de HBr o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles, tal i com ja havien suggerit altres autors [Joschek, 1966; Lipczynskakochany, 1992]. Per al 2-bromofenol es va identificar el 4-bromofenol com a fotoproducte. Aquesta transferència de l'àtom de brom de la posició orto a la para ja havia estat detectada per Akai i col·laboradors [Akai, 2002]. A més, amb consonància amb altres autors [Lipczynskakochany, 1992; Joschek, 1966; Durand, 1998; Bonnichon, 2001] es van identificar hidroxibenzens, àcid ciclopentadiènic i àcid metoxiciclopentadiènic entre els compostos de fotodegradació.

La majoria dels fotoproductes identificats per als bromofenols amb major nombre de broms (24DBP, 246TBP i PBP) són bromofenols amb menys àtoms de brom. Per tant, es va confirmar la desbromació reductora com a principal mecanisme dels processos de fotodegradació dels bromofenols. Es van

identificar també dihidroxibenzens bromats i hidroxibenzenones bromades entre els productes de fotodegradació, que suggereixen que la substitució d'un àtom de brom per un grup hidroxil o la formació d'una cetona són també unes de les principals vies de la fotodegradació, la qual cosa està en consonància amb els principals mecanismes de fotodegradació dels clorofenols [Rayne, 2009; Burrows, 1998]. Per als bromofenols amb un major grau de bromació, també es va suggerir la formació de HBr o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles com a productes finals del procés de fotodegradació.

Algunes espècies resoltes han quedat per identificar. Això és degut a que el procés de fotodegradació dels bromofenols no és ben conegut i a que hi ha molts productes de degradació dels quals no es té cap informació sobre la seva potencial identitat. A més, hi ha congèneres diferents (per exemple, els mateixos bromofenols) que poden donar espectres de masses idèntics o molt semblants, amb la qual cosa és impossible tenir una identificació definitiva.

Tal com s'ha comentat anteriorment, per a fer l'estudi de l'efecte de fotodegradació en funció de la llum es va prendre com a exemple la degradació del 2-bromofenol. A partir dels espectres de masses resolts dels experiments del 2-bromofenol realitzats sota fonts de radiació diferents, es van identificar molts productes comuns tals com el 4-bromofenol, dihidroxibenzens, HBr o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles. No obstant això, en la degradació induïda amb el simulador de llum solar no es va detectar la formació d'un producte amb valors m/z de 79/81, atribuïble a HBr o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles que sí s'identificava en la degradació induïda amb llum UV com a un dels últims productes formats. El fet que la degradació amb el simulador de llum solar sigui més lenta podria explicar que en el temps en què s'ha dut a terme l'experiment no s'hagi arribat

a formar aquest compost. D'aquesta manera es pot confirmar que la font de radiació afecta principalment la cinètica de degradació i no la identitat dels productes de fotodegradació majoritaris.

5.3.1.3. ACOBLAMENT DE LES DADES CROMATOGRÀFIQUES I ESPECTROSCÒPIQUES

Com hem pogut observar, el nombre de components resolts en les dades de l'experiment cromatogràfic de HPLC-DAD és superior a l'obtingut a partir de l'experiment espectroscòpic per a tots els bromofenols.

En el cas dels bromofenols amb major nombre de broms (diromo, tribromo i pentabromo), el nombre de fotoproductes resolts en l'experiment cromatogràfic és molt alt i l'acoblament de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques no és viable, tal com s'indicava en la secció 5.1.1.2. En aquests casos, les informacions extretes de l'experiment cromatogràfic proporcionaran una idea qualitativa sobre l'evolució cinètica dels productes de degradació i la identificació dels productes de fotodegradació a partir dels espectres de MS, mentre que l'experiment espectroscòpic proporcionarà les constants cinètiques aparents associades al procés de fotodegradació.

En el cas dels monobromofenols, el nombre de fotoproductes trobats cromatogràficament i espectroscòpicament és més similar. Per tant, en aquest cas sí és possible analitzar simultàniament les dades de l'experiment cromatogràfic amb detecció DAD acoblades amb les dels experiments per seguiment espectroscòpic.

En l'article 5.3-II es mostren els resultats que s'han obtingut amb aquest tipus d'estratègia per a la fotodegradació del 2-bromofenol sota llum UV. La matriu augmentada per a la resolució de l'acoblament cromatogràfic/espectroscòpic es va construir utilitzant l'experiment espectroscòpic complet i una selecció d'informació cromatogràfica representativa de tots els fotoproductes formats (vegeu Figura 5.3-7). En aquesta figura es mostra l'exemple d'un cromatograma mitjà del 2-bromofenol, en què les finestres d'elució T_w1 , T_w2 i T_w3 contenen un únic compost i les anomenades T_w4 i T_w5 un conjunt de compostos coeluits.

Entre tots els cromatogrames recollits en el procés de degradació, es van seleccionar les finestres T_w1 , T_w2 i T_w3 d'aquells cromatogrames en què el compost eluït relacionat presentava major concentració. Es van triar també dues parelles de finestres T_w4 i T_w5 , de cromatogrames en què els pics coeluits fossin força visibles. Només aquesta informació cromatogràfica es va acoblar a l'experiment espectroscòpic per a formar la matriu augmentada de l'acoblament espectroscòpic/cromatogràfic. D'aquesta manera es va tenir una bona definició dels compostos i es va reduir dràsticament la mida de l'estructura multiconjunt que calia analitzar.

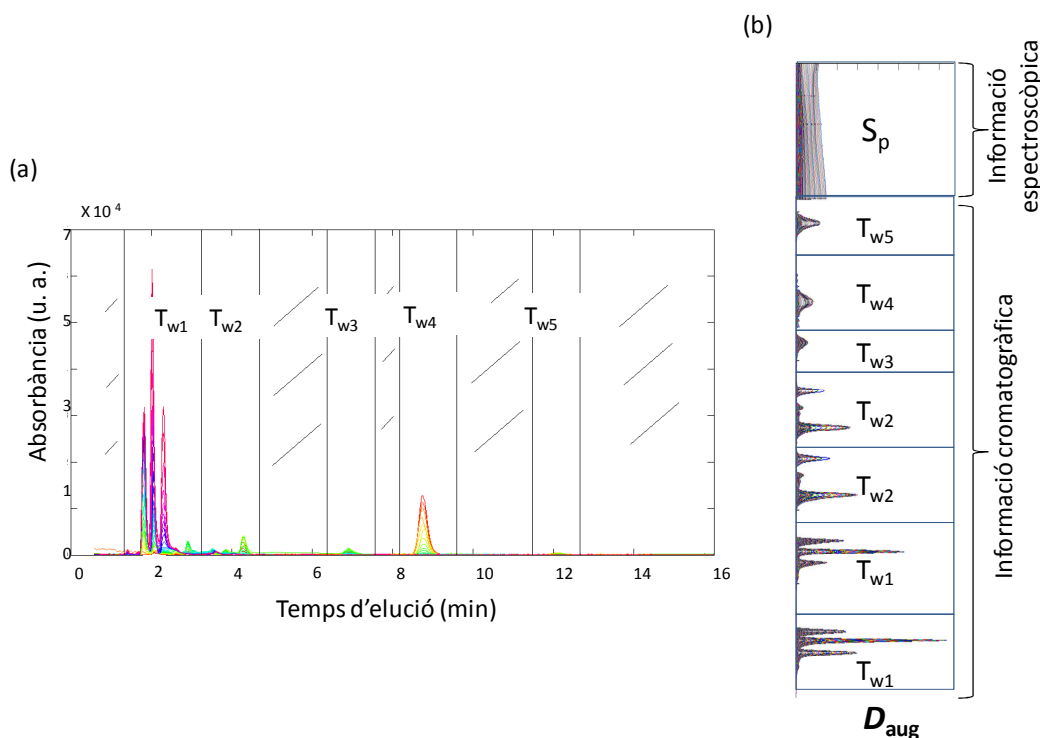


Figura 5.3-7. (a) Cromatograma mitjà del 2-bromofenol. (b) Estratègia de l'acoblament del seguiment cromatogràfic amb el seguiment espectroscòpic que s'ha dut a terme.

En aquesta anàlisi, es van aplicar les restriccions habituals de no negativitat (a la matriu S^T i la matriu C), unimodalitat en la direcció de les concentracions i normalització d'espectres, però la restricció més important és la de correspondència entre espècies. En aquest cas, les finestres cromatogràfiques contenen informació selectiva (T_{w1} , T_{w2} i T_{w3}) o de rang local molt rellevant (en T_{w4} i T_{w5} es pot dir clarament quins fotoproductes són absents). Tota aquesta informació de presència i absència de compostos es pot codificar en la restricció de correspondència d'espècies i ajuda enormement a augmentar la qualitat de la resolució final.

En la Figura 5.3.8 es mostren els resultats de resolució amb MCR-ALS de l'acoblament espectroscòpic/cromatogràfic. Es pot observar una descripció

més detallada de l'evolució cinètica en l'experiment espectroscòpic a causa de la informació addicional que aporten les dades cromatogràfiques per a distingir entre components. A més, es pot concloure que la fotodegradació del 2-bromofenol és un procés complex, en què molts compostos presenten una evolució cinètica similar. Això pot suggerir la presència d'un mecanisme de reaccions paral·leles, de segon ordre o superior.

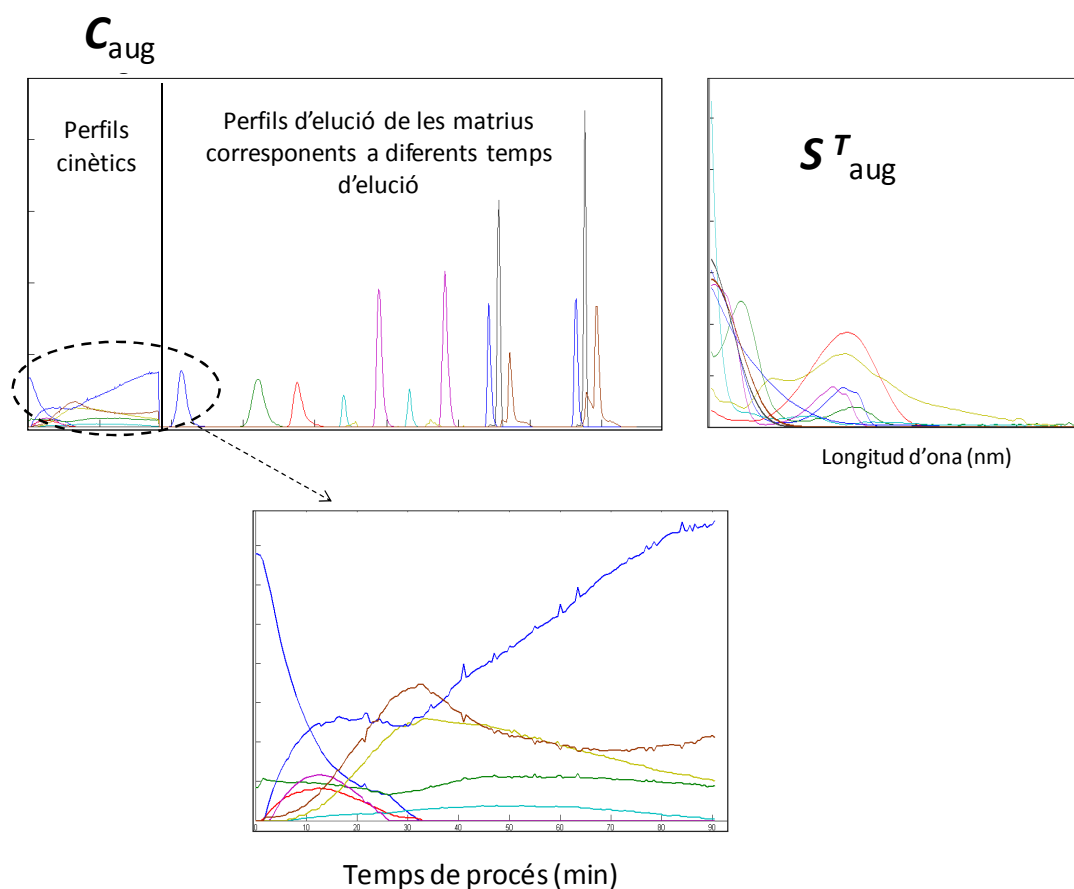


Figura 5.3-8. Resolució amb MCR-ALS de l'acoblament de dades cromatogràfiques i espectroscòpiques per a la fotodegradació del 2-bromofenol

En el cas de la fotodegradació del 2-bromofenol no s'han pogut identificar tots els productes de fotodegradació i no es té prou coneixement sobre la química que governa aquest procés; per tant, no és possible l'aplicació de la

modelització híbrida HS-MCR, ja que no hi ha prou informació per a postular un model cinètic fiable que doni forma als perfils de procés obtinguts.

En resum a partir dels estudis dels processos de fotodegradació dels bromofenols podem concloure que:

- Els processos de fotodegradació dels bromofenols són complexos i donen lloc a amb un nombre elevat de fotoproductes. L'evolució de la concentració d'aquests productes amb el temps suggereix la presència de reaccions paral·leles, de segon ordre o superior.
- La posició dels àtoms de brom en l'estructura del bromofenol i el grau de bromació afecten la cinètica de degradació i la natura i nombre de fotoproductes formats. S'observa que el monobromofenol amb el brom amb posició para i els bromofenols més pesants (més bromats) presenten la major velocitat de degradació. S'observa també que el nombre de productes de degradació augmenta en fer-ho el grau de bromació del compost parental.
- Els fotoproductes identificats mitjançant la informació de l'anàlisi de dades HPLC-MS suggereixen que la desbromació gradual, la substitució d'un àtom de brom per un grup hidroxil i la formació de cetones són les principals vies de la fotodegradació dels bromofenols.
- Les fonts de radiació assajades (llum UV i llum solar simulada) afecten la cinètica de fotodegradació dels bromofenols, però no la identitat dels seus fotoproductes. Com més energètica és la radiació utilitzada, més alta és la velocitat de degradació.

5.3.2. BIBLIOGRAFIA

[Akai, 2002]

N. Akai, S. Kudoh, M. Takayanagi, M. Nakata. *Photoreaction mechanisms of 2-bromophenols studied by low-temperature matrix-isolation infrared spectroscopy and density-functional-theory calculation*. Chem. Phys. Lett. 363 (2002) 591.

[Bonnichon, 2001]

F. Bonnichon, C. Richard, G. Grabner. *Formation of an α -ketocarbene by photolysis of aqueous 2-bromophenol*. Chem. Commun. 1 (2001) 73.

[Burrows, 1998]

H.D. Burrows, L.S. Ernestova, T.J. Kemp, Y.I. Skurlatov, A.P. Purmal, A.N. Yermakov. *Kinetics and mechanism of photodegradation of chlorophenols*. Prog. React. Kinet. Mech. 23 (1998) 145

[Durand, 1998]

A-P. Durand, R. G. Brown, D. Worrall, F. Wilkinson. *Study of the aqueous photochemistry of 4-fluorophenol, 4-bromophenol and 4-iodophenol by steady state and nanosecond laser flash photolysis*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 (1998) 365.

[Joschek, 1966]

H-I. Joschek, *Photocleavage of phenoxyphenols and bromophenols*. J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 3269.

[Lipczynskakochany, 1992]

E. Lipczynskakochany. *Direct photolysis of 4-Bromophenol and 3-Bromophenol as studied by a flash photolysis/HPLC technique*. Chemosphere 24 (1992) 911.

[Maeder, 1990]

M. Maeder, A.D. Zuberbuhler, *Nonlinear least-squares fitting of multivariate absorption data*. Anal. Chem. 62 (1990) 2220.

[Rayne, 2009]

S. Rayne; K. Forest; K. J. Friesena. *Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives. A review*. Environ. Int. 35 (2009) 425.

CAPÍTOL6:

Conclusions

1. S'ha revisat bibliogràficament la metodologia quimiomètrica per a interpretar la informació present en les dades experimentals de tipus ambiental que involucren contaminants orgànics. S'ha observat que el nombre de publicacions sobre la utilització de mètodes quimiomètrics en la química ambiental creix de forma continuada i mostra la importància que té l'ús de la quimiometria en l'anàlisi de dades que provenen fonamentalment de campanyes de seguiment o vigilància ambiental, de determinacions analítiques en mostres ambientals o d'estudis de l'estimació de l'activitat toxicològica de contaminants ambientals.

2. S'ha observat que el mètode PCA és una de les tècniques quimiomètriques més emprades en dades obtingudes en campanyes de seguiment i vigilància ambiental. No obstant això, s'han aplicat també altres mètodes basats en l'anàlisi de factors com el UNMIX, la PMF i el MCR-ALS. Quan les dades ambientals són més complexes (estructures de cubs o hipercubs) apliquen els mètodes d'anàlisi multidireccional com el PARAFAC i mètodes basats en models TUCKER3 i ME. En canvi, quan s'analitzen simultàniament taules de dades que no permeten la construcció d'estructures regulars cúbiques o hipercúbiques, els mètodes basats en l'ús de models bilineals, com PCA o MCR-ALS semblen ser les opcions més adequades. Per a la determinació quantitativa s'apliquen tècniques de calibratge multivariant. Quan la mesura proporciona un vector de dades s'utilitzen els mètodes de calibratge multivariant de primer ordre. Si la resposta instrumental és una matriu de dades, s'utilitzen els mètodes de calibratge multivariant de segon ordre i per a dades més complexes (de tres o més direccions) s'apliquen mètodes de calibratge multivariant d'ordre superior. Finalment, s'ha observat que per a

desenvolupar els models QSARs com a eina per a avaluar els efectes toxicològics d'un contaminant s'utilitzen mètodes de regressió lineal; entre ells, el més utilitzat el PLS i les tècniques no lineals, de les quals les més utilitzades són ANN i SVM.

3. S'ha proposat una metodologia general de seguiment experimental, tractament quimiomètric i interpretació de resultats per a processos de fotodegradació. El seguiment experimental proposat es basa en utilitzar tècniques espectroscòpiques d'absorció molecular i cromatogràfiques (HPLC-DAD i HPLC-MS) les quals donen informacions complementàries per a la interpretació d'aquests sistemes. Per al tractament de les dades s'ha suggerit el mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats amb modelització flexible (MCR-ALS) i amb modelització híbrida rígida i flexible (HS-MCR) els quals permeten l'estimació dels perfils de concentració i dels espectres purs dels diferents productes de degradació, així com de les constants de velocitat associades al procés. Quan el procés de fotodegradació presenta poques espècies i/o es té un coneixement previ de la fotoquímica del sistema s'ha suggerit l'ús de nous acoblaments HPLC-DAD-MS i cromatogràfic/espectroscòpic per a combinar els avantatges de cadascuna de les mesures i extraure la màxima informació del procés en estudi.

4. S'ha demostrat que l'aplicació de MCR-ALS a la fusió de senyals cromatogràfiques DAD-MS és una eina molt poderosa per a la modelització i identificació de tots els compostos involucrats en el sistema de fotodegradació. Aquest tipus d'anàlisi proporciona un resultat de major qualitat que l'anàlisi de les dades obtingudes pels dos detectors per separat, ja que inclou molta més informació en l'anàlisi i disminueix l'ambigüïtat de les solucions obtingudes. A

més, permet obtenir una millor caracterització dels productes de degradació (espectres MS) i informació sobre la seva evolució cinètica a partir de la gràfica de les àrees dels pics resolts en funció dels diferents temps de procés. S'ha demostrat també que l'aplicació de HS-MCR a la fusió de les dades cromatogràfiques i espectroscòpiques permet aconseguir una descripció completa del mecanisme de procés i proporcionar els paràmetres cinètics. Amb aquesta anàlisi s'obté una millor descripció de la cinètica del procés de fotodegradació a causa de que es té una bona definició del temps de procés donada per l'experiment espectroscòpic. A més, gràcies a la informació cromatogràfica es poden modelar totes les espècies presents en el procés i s'elimina la deficiència de rang que poden presentar les dades espectroscòpiques pel fet que existeixin compostos que presentin perfils cinètics idèntics o molt similars.

5. S'han mostrat les capacitats d'aquests nous acoblaments sobre l'estudi de la fotodegradació del ketoprofèn. El ketoprofèn ha estat escollit perquè és un sistema simple en el qual hi ha poques espècies involucrades i, a més, es té un coneixement bàsic de la seva fotoquímica. S'ha obtingut una descripció completa de la cinètica del procés de fotodegradació d'aquest fàrmac amb tots els passos successius, constants cinètiques i fotoproductes formats. S'ha observat que la degradació del ketoprofèn sota l'acció de la llum és un procés molt ràpid i presenta una descarboxilació fotolítica com a principal mecanisme de fotodegradació, dóna lloc de manera paral·lela a la formació de 3-(1-hidroperoxietil)benzofenona, 3-acetilbenzofenona, 3-etilbenzofenona i 3-(1-hidroxietil)benzofenona.

6. En l'estudi de processos de degradació de contaminants bromats, s'ha triat investigar el procés de fotodegradació del producte comercial DecaBDE, que està format gairebé exclusivament pel decabromodifenilèter (BDE209). S'ha presentat una descripció completa de la fotodegradació d'aquest PBDE amb totes les etapes successives de degradació i les constants cinètiques relatives relacionades. S'ha observat que el procés de fotodegradació del DecaBDE és un sistema complex en el qual hi ha involucrats un gran nombre de productes. Els resultats de l'anàlisi de les dades obtingudes pels seguiments espectroscòpic d'absorció molecular i cromatogràfic (GC-MS) indiquen que el sistema es pot descriure mitjançant un sistema de tres reaccions consecutives de primer ordre: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$. A partir dels resultats de GC-MS s'ha observat que els components B, C i D corresponen a mescles de congèneres amb menys nombre de broms que el DecaBDE. No obstant això, per la forma dels espectres UV purs se suggereix també la possible formació simultània de dibenzofurans polibromats (PBDF) entre els productes de degradació. D'aquesta manera es postula que el DecaBDE es pot transformar en compostos més tòxics, com congèneres amb un nombre menor de broms i dibenzofurans. Per tant s'adverteix de l'impacte ambiental i de l'amenaça per la salut pública de l'ús del DecaBDE.

7. S'han demostrat els avantatges del mètode de modelització híbrida (HS-MCR) en l'anàlisi simultània d'experiments realitzats en diferents mescles THF-aigua. Amb la incorporació dels models globals en el mètode HS-MCR s'ha aconseguit una estimació més acurada de les constants cinètiques i la possibilitat de treballar amb experiments realitzats en condicions lleugerament diferents (amb efecte del solvent sobre la forma espectral, que es modela de

forma flexible com una contribució addicional). A partir d'aquesta anàlisi simultània d'experiments realitzats en diferents proporcions d'aigua en el solvent s'ha estudiat l'efecte de la polaritat del solvent en la fotodegradació del DecaBDE. S'ha observat una petita disminució de les constants de velocitat quan augmenta la proporció d'aigua en el solvent. Dels resultats obtinguts s'ha pogut fer una extrapolació del comportament fotoquímic del DecaBDE en aigua. A més, a partir d'aquesta anàlisi simultània s'ha observat que els valors de les constants aparents (k_1 , k_2 i k_3) segueixen una seqüència decreixent per a totes les composicions de solvents. Atès que existeix una desbromació successiva del DecaBDE sembla que la velocitat de fotodegradació dels PBDE disminueix en disminuir el grau de bromació.

8. S'ha estudiat la biodegradació del producte comercial DecaBDE amb la finalitat de tenir un coneixement més ampli sobre el destí ambiental d'aquest compost. Per una part, s'ha proposat una nova metodologia d'anàlisi per a la determinació de possibles productes de biodegradació dels PBDE (els seus derivats hidroxilats, els OH-PBDE) i per l'altra banda s'ha estudiat la biodegradació *in vitro* del DecaBDE mitjançant microsomes de fetge de rata

9. S'ha establert un nou mètode d'anàlisi per a vuit OH-PBDE (de di a tetra bromats) en quatre mostres ambientals (matèria particulada, sediment, fang i biota) mitjançant HPLC-MS/MS, el qual no requereix derivatització prèvia d'aquets compostos. S'han obtingut bons límits de detecció i una reproductibilitat i repetibilitat satisfactòries. La situació del grup hidroxil afecta la fragmentació dels compostos. Aquest fet s'aprofita, ja que les

diferents transicions en MRM que presenten els diferents OH-PBDE permeten solucionar les dificultats associades a problemes de coelució.

10. S'ha estudiat la biotransformació del producte comercial DecaBDE mitjançant microsomes de rates enriquits amb CYP2B, CYP1A i CYP4A3. S'ha observat una disminució de la quantitat del compost original, la qual cosa significa que es produeix biotransformació. Els microsomes enriquits amb CYP2B indueixen una major biodegradació del DecaBDE que els microsomes enriquits amb CYP1A i CYP4A3 a causa de l'estructura no planar del DecaBDE. No s'ha pogut detectar cap producte de biodegradació mitjançant les metodologies proposades de HPLC-MS/MS i GC-MS. Es creu que els metabòlits de la fase I del DecaBDE poden tenir una possible interacció amb els components cel·lulars, que se'n fa més difícil la detecció en les condicions experimentals de les metodologies cromatogràfiques proposades.

11. S'ha descrit la fotodegradació de sis bromofenols amb diferent grau de bromació (dels monobromofenols fins al pentabromofenol). S'ha investigat l'efecte del grau de bromació, de la posició del brom en l'estructura de la molècula i de la font de radiació utilitzada sobre el mecanisme i la natura dels productes formats durant la fotodegradació.

12. El processos de fotodegradació dels bromofenols estudiats (2BP, 3BP, 4BP, 24DBP, 246TBP i PBP) mitjançant seguiment espectroscòpic s'han pogut descriure mitjançant poques contribucions que segueixen una llei cinètica de reaccions consecutives de primer ordre. Les constants cinètiques obtingudes s'interpreten com a constants cinètiques aparents, ja que el nombre de

contribucions modelat és menor que el nombre d'espècies químiques per la similitud en l'evolució cinètica i els espectres purs de moltes espècies involucrades en el procés.

13. L'anàlisi de les dades corresponents al seguiment dels processos de fotodegradació amb cromatografia de líquids i detecció DAD ha permès modelar totes les espècies involucrades en el sistema perquè el seu patró d'elució és diferent, tot i que la resta de característiques s'assemblin entre elles. S'han resolt de set a nou compostos per als monobromofenols, dotze per al 2,4-dibromofenol, quinze per al 2,4,6-tribromofenol i fins a 34 compostos per al pentabromofenol. En comparar els resultats obtinguts per a cada bromofenol, s'observa que hi ha espècies resoltes que són les mateixes en tots els casos i espècies pròpies de cadascun dels compostos. Sembla que la pèrdua successiva d'àtoms de brom és el principal mecanisme de la fotodegradació dels bromofenols. Aquest tipus de seguiment cromatogràfic també ha proporcionat informació sobre l'evolució cinètica dels productes de degradació a partir de la representació de les àrees dels pics resolts en funció del temps de procés. Es detecta que són sistemes complexos que es basen en cinètiques de reaccions paral·leles o de segon ordre o superior.

14. Les dades obtingudes en els processos de fotodegradació dels bromofenols mitjançant seguiment amb cromatografia de líquids i detecció per espectrometria de masses tenen un soroll de fons important, la qual cosa en fa més difícil l'anàlisi i la detecció d'espècies minoritàries. Els pics detectats no sempre coincideixen amb els modelats a partir de la detecció DAD, la qual cosa dificulta l'acoblament de les dades obtingudes pels dos sistemes de detecció. A partir dels espectres de MS resolts s'han pogut caracteritzar

diversos productes de fotodegradació. Per als monobromofenols s'ha postulat la formació de HBr o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles, hidroxibenzens, àcid ciclopentadiènic i àcid metoxiciclopentadiènic. Per al 2-bromofenol es va identificar també el 4-bromofenol com a fotoproducte. La majoria dels fotoproductes identificats per als bromofenols amb major nombre de broms (24DBP, 246TBP i PBP) van ser bromofenols amb menor grau de bromació. Per tant, es va confirmar la desbromació reductora com a principal mecanisme dels processos de fotodegradació dels bromofenols. S'han identificat també dihidroxibenzens bromats i hidroxibenzenones bromades i HBr i/o altres compostos bromats amb estructures alifàtiques senzilles. Han quedat algunes espècies per identificar, ja que el procés de fotodegradació dels bromofenols no és ben conegut i hi ha molts productes de degradació dels quals no es té cap informació sobre la seva potencial identitat. A més, hi ha congèneres diferents que poden donar espectres de masses idèntics o molt semblants, amb la qual cosa és impossible tenir una identificació definitiva.

15. En comparar les constants de velocitat de degradació dels tres monobromofenols s'ha vist que la posició del brom en l'estructura de la molècula té un efecte clau en la cinètica de degradació. El brom en posició para fa augmentar la velocitat de fotodegradació. També s'observa que en incrementar el grau de bromació també augmenta lleugerament la velocitat de degradació. El principal efecte de les diferents fonts de llum emprades (llum UV i simulador de llum solar) sobre la fotodegradació de 2-bromofenol està vinculat a la velocitat del procés de fotodegradació, però no a la identitat dels

seus fotoproductes formats. S'observa que com més energètica és la radiació utilitzada, més alta és la velocitat de degradació.

16. L'anàlisi de dades combinant les dades cromatogràfiques amb detecció DAD i les dades de seguiment espectroscòpic en el procés de fotodegradació del 2-bromofenol mostra que les espècies cromatogràfiques també es detecten en l'experiment de seguiment espectroscòpic si la informació de tots dos experiments es tracta de manera conjunta. Els resultats confirmen la complexitat del procés i l'existència de reaccions paral·leles o de segon ordre o superior en el sistema. Tot i la bona definició dels perfils cinètics no s'ha pogut postular cap model cinètic a causa de la falta d'informació sobre la identitat de tots els fotoproductes i sobre la química de fotodegradació dels bromofenols. Hi ha massa models possibles que formalment es podrien ajustar a les dades amb una qualitat similar, però la manca d'informació addicional i el gran nombre de compostos que intervenen en el procés, no permet justificar la tria raonada d'un model particular entre les diferents possibilitats.